

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Origen de las poblaciones introducidas de *Scinax quinquefasciatus* (Anura:
Hylidae) en las islas Galápagos

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Biológicas

DIANA ALEXANDRA PAZMIÑO JARAMILLO

Quito, 2011

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata Diana Alexandra Pazmiño Jaramillo ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Santiago R. Ron

Director de la Disertación

Noviembre de 2011

A mis padres, hermano y amigos por el apoyo incondicional
y la confianza durante este proyecto de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Santiago R. Ron, por su guía durante el proceso de elaboración de este trabajo y sus valiosas observaciones sobre el mismo.

Agradezco a los Doctores Omar Torres y Santiago Burneo, por el tiempo y aportes que han proporcionado al proyecto, al personal del museo de Zoología QCAZ y del Laboratorio de Biología Molecular cuyo soporte físico y moral ha sido de gran importancia.

De forma especial quiero agradecer también a mis amigos Diego Páez, Marcel Caminer, Natalia Andrade, Alejandro Janeta, Diego Ortiz, Verónica Saenz, Stephany Villota, Nathaly Portero, Eduardo Toral, por la confianza y cariño que me han llevado siempre hacia delante. A Lien Gonzáles, María Eugenia Ordóñez y Charles Barnes. Quiero también agradecer a Ana Troya, por su guía y apoyo.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, que además de brindarme el conocimiento y los valores que hoy poseo, me ha dado el espacio físico para llevar a cabo esta tesis. Al proyecto PIC 08-0470 “Inventario y caracterización genética y morfológica de la diversidad de reptiles, aves y anfibios de los Andes del Ecuador”, financiado por el SENESCYT, por el soporte económico para las fases de campo y laboratorio de este trabajo.

Al Parque Nacional Galápagos y en especial a Washington Tapia, ex director del mismo, por su colaboración con los permisos de colección e información de los especímenes de *S. quinquefasciatus* de Pto. Villamil. A la Estación Científica Charles Darwin, William E. Duellman y la Universidad de Kansas, por el préstamo de tejidos de sus respectivas colecciones.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
3.1. ESTUDIOS DE FILOGEOGRAFÍA.....	5
3.2. ESPECIE ESTUDIADA.....	5
3.2.1. <i>Scinax quinquefasciatus</i>	5
3.3. ANTECEDENTES.....	6
3.4. CONDICIONES CLIMÁTICAS EN GALÁPAGOS.....	8
3.5. CONDICIONES AMBIENTALES Y DIVERSIFICACIÓN EN LA REGIÓN CHOCÓ.....	9
3.6. MARCADORES MOLECULARES.....	10
3.7. OBJETIVOS.....	12
3.7.1. OBJETIVO GENERAL.....	12
3.7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
4.1. MUESTREOS POBLACIONALES.....	13
4.2. EXTRACCIÓN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL	

ADN.....	13
4.3. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS.....	14
4.3.1. MÁXIMA PARSIMONIA.....	14
4.3.2. INFERENCIA BAYESIANA.....	15
4.4. EVENTOS DE INVASIÓN.....	16
4.5. EXPANSIÓN POBLACIONAL.....	17
4.6. RED DE HAPLOTIPOS.....	18
4.7. DIVERSIDAD GENÉTICA.....	18
4.8. FACTORES AMBIENTALES.....	19
5. RESULTADOS.....	20
5.1. RELACIONES FILOGENÉTICAS.....	20
5.2. DIVERSIDAD GENÉTICA.....	22
5.3. EXPANSIÓN POBLACIONAL.....	23
5.4. RED DE HAPLOTIPOS.....	24
5.5. FACTORES AMBIENTALES.....	24
6. DISCUSIÓN.....	26
6.1. <i>Scinax quinquefasciatus</i> EN GALÁPAGOS.....	26
6.2. EXPANSIÓN POBLACIONAL Y ESTRUCTURA GENÉTICA EN	

EL CONTINENTE.....	27
6.3. RELACIONES FILOGENÉTICAS.....	28
6.4. IMPLICACIONES.....	29
7. LITERATURA CITADA.....	31
8. FIGURAS.....	38
9. TABLAS.....	45
10. ANEXOS.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Mapa de localidades muestreadas en este estudio.....	39
Figura 2.	Filograma resultante del análisis bajo el criterio de Inferencia Bayesiana de los genes 12S, ND1, CO1 y CYTB.	40
Figura 3.	Árbol consenso (regla de mayoría al 50%) producto del análisis bajo el criterio de Máxima Parsimonia para los genes 12S, ND1, CO1 y CYTB	41
Figura 4.	Histograma de la distribución normal de la diferencia de longitudes de árbol para comprobar el soporte de la relación filogenética entre las poblaciones de (A) Galápagos y Los Ríos, (B) Galápagos y Guayas y (C) Galápagos como un clado monofilético, mediante un análisis de bootstrap paramétrico.....	42
Figura 5.	Red de haplotipos de los individuos de <i>Scinax quinefasciatus</i> empleados en los análisis.....	43
Figura 6.	Datos de colecta y precipitación en las Islas Galápagos (Puerto Ayora, Isla Santa Cruz) y en Guayaquil entre 1991 y 2009.....	44

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Regiones de ADN y cebadores empleados en este estudio.....	46
Tabla 2.	Protocolos para amplificar los genes mitocondriales 12S, ND1, CO1 y CYTB, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	48
Tabla 3.	Modelos de sustitución de las particiones empleadas en los análisis filogenéticos de inferencia Bayesiana.....	49
Tabla 4.	Resultado del AMOVA para las poblaciones continentales de <i>S.</i> <i>quinquefasciatus</i>	50

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.	Lista de individuos colectados durante el estudio y depositados en el Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.....	52
Anexo 2.	Protocolo de la extracción de ADN.....	58
Anexo 3.	Producto de amplificación de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para el gen 12 S corrido en un gel de agarosa 1%	60
Anexo 4.	Estadísticas de precipitación en la isla Santa Cruz tomadas de la publicación de Trueman y d'Ozouville (2010).....	61
Anexo 5.	Precipitación mensual (mm) y medias mensuales de la temperatura superficial del mar en la Estación Científica Charles Darwin entre 1965 y 2008. Figura tomada de la publicación de Trueman y d'Ozouville (2010)...	62
Anexo 6.	Relación entre la riqueza local de especies y el tiempo de colonización, figura tomada de la publicación de Wiens <i>et al.</i> (2011)..	63
Anexo 7.	Lista de haplotipos empleados en el análisis.....	64
Anexo 8.	Fragmentos secuenciados por cada individuo.....	70
Anexo 9.	Matriz de distancias genéticas basada en los genes 12S, ND1, CO1 y CYTB de los individuos de <i>S. quinquefasciatus</i> en el continente.....	74
Anexo 10.	Matriz de distancias genéticas basada en los genes 12S, ND1, CO1 y CYTB de los individuos de <i>S. quinquefasciatus</i> en Galápagos.....	77

1. RESUMEN

En el año 1998, se registró la primera población establecida de la rana *Scinax quinquefasciatus* en la isla Isabela, Archipiélago de Galápagos. Recientemente también fue registrada en la isla Santa Cruz. Se desconoce la población de origen para esta invasión y el medio por el que lograron llegar a las islas. En el presente estudio se muestrearon 2928 pb de ADN de genes mitocondriales (12S, ND1, CO1 y CYTB) de 53 individuos de 26 poblaciones continentales y una introducida (Puerto Villamil) de *S. quinquefasciatus* para determinar la población de origen así como el número de eventos de invasión de las islas Galápagos.

El análisis de inferencia Bayesiana concuerda con el de Máxima Parsimonia: ambos muestran tres clados bien definidos y con buen soporte entre las poblaciones continentales de *S. quinquefasciatus*. Los clados son parapátricos y se reemplazan latitudinalmente. El clado Norte se distribuye en las provincias de Esmeraldas y la zona norte de Manabí; el clado Centro en la zona sur de Manabí, Los Ríos y el norte de Guayas; y el clado Sur en Guayas y El Oro. El clado Centro presenta dos grupos genéticos diferenciados simpátricos y con alto soporte. Las muestras de Galápagos (Puerto Villamil, Isla Isabela) pertenecen a ambos grupos. Pruebas de topología en base a bootstraps paramétricos rechazaron la hipótesis de monofilia en la población insular, lo cual sugiere que han existido al menos dos eventos de colonización. En cuanto a la diversidad genética, el análisis molecular de varianza (AMOVA) revela mayor variabilidad entre los grupos (78,39%) que dentro de ellos (21,61%). Estas diferencias son altamente significativas con un $p = 0,000$. Se encontró un rango de distancias genéticas (basado en los genes 12S, ND1, CO1 y CYTB) de 0,03 a 3% entre las poblaciones continentales. Pruebas de neutralidad (Tajima's $D = -0,09305$; Fu's $F = -4,67361$) sugieren que las poblaciones continentales han experimentado expansiones poblacionales recientes.

Los registros de colecta de *S. quinquefasciatus* en Galápagos coinciden con años de alta precipitación. El año de colonización de la isla Isabela coincide con un fenómeno del Niño de gran intensidad lo cual sugiere que si bien la introducción de especies invasivas es un producto de las actividades humanas, las condiciones ambientales pueden facilitar la llegada y establecimiento de las especies. La identificación de las condiciones ambientales facilitadoras puede ayudar a diseñar programas de cuarentena más eficientes.

Palabras clave: Colonización, especie invasiva, filogeografía, variabilidad genética.

1. ABSTRACT

In 1998, the first established population of the treefrog *Scinax quinquefasciatus* was reported from Isabela island (Galapagos archipelago). Recently, another population was found on Santa Cruz. The original population and the way these frogs were introduced on the Galapagos ecosystem are unknown. In this study, 2928 bp of mitochondrial DNA (12S, ND1, CO1 and CYTB genes) from 53 individuals of 26 continental populations and one introduced population (Puerto Villamil) of *S. quinquefasciatus* were analyzed in order to find the original population and the number of introduction events in Galapagos.

Phylogenetic analyses used to build trees included Bayesian and maximum parsimony methods. In this case, both analysis show similar results. Consensus trees show three defined clades with a good support (from bootstrap and posterior probabilities) for *S. quinquefasciatus* in mainland. Clades are parapatric and can be replaced in latitude, they also show a good correspondence with geographical data. Individuals from the North clade are distributed on Esmeraldas and the north part of Manabi; the Central clade corresponds to the south part of Manabi, Los Rios and the north of Guayas; and the South clade to Guayas and El Oro provinces. The central clade has two genetic differentiated groups, sympatric and with good support. Individuals from Galapagos (Puerto Villamil, Isabela island) belong to both groups of the Central clade. Topology tests based on parametric bootstrap rejected the hypothesis of monophyly for this population. It is possible that the introduction is the result of at least two colonization events. An Analysis of Molecular Variance (AMOVA), shows more variability between groups (78.39%) than within-groups (21.61%). Genetic distances were calculated based on genes 12S, ND1, CO1 and CYTB, we found a range of 0.03 to 3% between mainland populations. Tajima's *D* and Fu's *F* tests of neutrality on mainland populations suggest populations have recently experienced expansions (Tajima's *D* = -0.09305; Fu's *F* = -4.67361).

Collections of *S. quinquefasciatus* in Galapagos are consistent with years of high precipitation. The year of colonization corresponds to an El Niño event, which suggests the introduction of invasive species is not only the result of human activities but environmental factors could also help the arrival and establishment of these species. The knowledge of these environmental factors could contribute to design more efficient eradication programs.

Keywords: Colonization, genetic diversity, invasive species, phylogeography.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. ESTUDIOS DE FILOGEOGRAFÍA

Los estudios biogeográficos tienen como meta caracterizar los patrones de distribución de los organismos y determinar las condiciones ambientales, eventos históricos y fuerzas evolutivas que han dado forma a dichos patrones a largo y corto plazo (Lomolino *et al.*, 2004; Parent *et al.*, 2008).

En la actualidad las hipótesis biogeográficas se combinan con estudios moleculares para generar predicciones de estructura genética a varios niveles de divergencia (Riddle, 1996). Eventos demográficos, como crecimiento poblacional o cuellos de botella, producto de migraciones pueden incidir tanto en la estructura filogenética como en la variación genética de las poblaciones (Mahoney, 2004; Rogers y Harpending, 1992).

En el caso de la introducción de especies, los estudios filogeográficos nos permiten comprender la historia de colonización y nos brindan pistas en cuanto a los posibles factores que pudieron haber facilitado los eventos de colonización.

3.2. ESPECIE ESTUDIADA

El género *Scinax*, perteneciente a la subfamilia de los Hyliinae, se compone de un total de 105 especies formalmente reconocidas y ordenadas en cinco grupos de especies (*Scinax ruber*, *S. rostratus*, *S. catharinae*, *S. staufferi* y *S. perpusilla*). Está distribuido desde el sur de México hasta el este de Argentina (Faivovich, 2002).

3.2.1. *Scinax quinquefasciatus*

Scinax quinquefasciatus (Fowler, 1913) es una especie altamente adaptable a cambios ambientales, puede encontrarse en sistemas terrestres y también asociadas a cuerpos permanentes de agua. Se distribuye en las tierras bajas, entre 0 y 1 500 msnm, al

occidente del Ecuador y Colombia (Duellman, 1971; Frost, 2010). Está incluida en la categoría de Preocupación Menor en todo su rango de distribución (UICN, 2009) y también en el Ecuador (Ron *et al.*, 2011).

Scinax quinquemaculatus es una rana pequeña, de aproximadamente 35 mm de longitud rostro-cloacal (Duellman y Wiens, 1993). A pesar de que Faivovich (2005) la ubica dentro del clado de *S. ruber*, no ha sido asignada a un grupo de especies en particular porque no ha sido incluida en ningún análisis filogenético más detallado.

En el caso de las poblaciones de Galápagos, generalmente están asociadas a cuerpos de agua. Sin embargo, las condiciones en las localidades donde ha sido muestreada no son las mismas aun dentro de cada isla, así por ejemplo: en Puerto Villamil (Isabela) la población más grande se localiza en la Poza de las Diablas, cuya agua presenta un porcentaje de sal mayor al de las localidades cercanas al centro poblado de la isla pues, en marea alta, el mar alcanza dicho lugar mezclándose con el agua de la poza. En Santa Cruz, los cuerpos de agua a los que se asocia su presencia son producto de las lluvias en la zona agrícola (Bellavista), patrón que se observa también en las localidades continentales.

3.3. ANTECEDENTES

El archipiélago de Galápagos enfrenta el problema de especies introducidas desde el año 1535 aproximadamente y, aunque existe un gran esfuerzo para evitar la llegada de especies invasivas, cada vez es mayor el número de plantas y animales exóticos establecidos en las islas. En la actualidad, el número de animales introducidos reportados por el Parque Nacional Galápagos (2009) es de 579 (36 vertebrados y 543 invertebrados). Las acciones tomadas por el PNG, en su mayoría, se basan en la prevención de nuevos eventos de colonización, mediante un control permanente en los puertos y aeropuertos continentales, además del equipaje de quienes ingresan a diario al archipiélago. Para

impedir la llegada de especies exóticas se ha creado el SICGAL (Servicio de Inspección y Cuarentena para Galápagos, Jiménez-Uzcátegui *et al.*, 2007).

El único anfibio exótico establecido en Galápagos es *Scinax quinquefasciatus*. El primer registro fue en 1991, sin embargo no se reportaron nuevos registros hasta 1998, entre este año y el siguiente (1999) se estable la primera población en la isla Isabela. Aunque los primeros registros corresponden a la isla Santa Cruz, posteriormente hubieron colectas en San Cristóbal en los años de 2000 y 2001, luego de lo cual no se la volvió a reportar en esta isla (Parque Nacional Galápagos, 2009). Sin embargo las poblaciones de Isabela se establecieron en las pozas de la zona sur (Poza de las Diablas y Poza de los Flamencos), donde a pesar de las acciones tomadas por el PNG para su erradicación, no se las ha podido controlar, ni se ha logrado hallar un método satisfactorio para su erradicación. La falta de información es probablemente una de las principales dificultades que deben superarse para que los esfuerzos sean exitosos (Jiménez-Uzcátegui *et al.*, 2007).

En el caso de Santa Cruz, existen pocos registros de *S. quinquefasciatus* desde la primera colecta en 1991 hasta los años 2002 y 2003. En los años 2004, 2006 y 2008 los registros vuelven a ser bajos hasta julio del 2011, cuando se observan poblaciones tanto en el puerto como en la zona agrícola de Bellavista (Fundación Charles Darwin, 2011).

Aún cuando se sospecha que *S. quinquefasciatus* procede de la zona litoral del Ecuador continental, es posible que procedan también de las costas de Colombia, pues su rango de distribución se extiende hasta esta zona. Sin embargo esto no se ha confirmado y es incierta la población o poblaciones de las que proviene (Jiménez-Uzcátegui *et al.*, 2007). Si bien ahora es la única especie de anfibio en el Archipiélago, han existido otros eventos no exitosos de invasión de anfibios como el de *Rhinella marina* y *Pristimantis unistrigatus* por lo que las condiciones ambientales específicas podrían ser un factor determinante para el establecimiento de especies introducidas.

3.4 CONDICIONES CLIMÁTICAS EN GALÁPAGOS

Galápagos, por su ubicación en el Pacífico oriental, posee un clima estacional único, que no se observa en otras islas oceánicas ecuatoriales. Varios factores, entre ellos las corrientes oceánicas y vientos regidos por el movimiento de la Zona de Convergencia Intertropical (ZCI) influyen directamente sobre el clima del archipiélago. Además, el fenómeno periódico de El Niño a lo largo del Pacífico es otro factor influyente sobre dichas condiciones (Trueman y d'Ozouville, 2010).

Como consecuencia de los eventos de El Niño, la temperatura superficial del agua tiende a subir, dicha condición, asociada al desplazamiento norte-sur de la ZCI provocan lluvias torrenciales, incremento en la temperatura del aire y estaciones secas más prolongadas de lo normal (Snell y Rea, 1999).

Trueman y d'Ozouville (2010), tras un estudio bastante detallado de las condiciones climáticas en las zonas alta y baja en seis islas del archipiélago, sugieren que la zona baja es vulnerable a un clima más caliente y más húmedo durante eventos de El Niño, lo que podría favorecer el establecimiento de especies invasoras, amenazando así a las especies endémicas adaptadas a las condiciones de dicha zona.

El estudio de las condiciones climáticas y su relación con la biodiversidad en Galápagos es de gran importancia, más aún en el caso de las especies introducidas, pues la identificación de factores ambientales específicos que permiten a dichos organismos su llegada y establecimiento en un ecosistema tan frágil, podría ayudar a impedir su llegada y facilitar su erradicación.

3.5. CONDICIONES AMBIENTALES Y DIVERSIFICACIÓN EN LA REGIÓN CHOCÓ

Los patrones geográficos actuales de la diversidad genética y morfológica son el producto de procesos históricos y procesos de selección que, además de restringir, han moldeado y dispersado la flora y fauna del planeta. Los ciclos glaciales del cuaternario son considerados los procesos históricos naturales más importantes, pues sus efectos en los patrones de filogeografía se encuentran bien documentados, sobre todo en el hemisferio Norte (Avise, 2000). Sin embargo, durante los últimos años, la información para el hemisferio Sur, especialmente para la Patagonia, está creciendo cada vez más (Ruzzante *et al.*, 2011).

El área biogeográfica del Chocó corresponde a una franja de bosque lluvioso de aproximadamente 1 000 km de largo y 100 km de ancho que se extiende a lo largo de las costas del Pacífico al sudoeste de Panamá, Oeste de Colombia y noroeste de Ecuador (Behling *et al.*, 1998; Vélez *et al.*, 2001). Se caracteriza por su alta precipitación anual (entre 7 500 y 12 000 mm/año), y por ser un sitio de gran biodiversidad.

Estudios de palinología en la región del Chocó han permitido develar sus condiciones climáticas pasadas (del último período glacial y el Holoceno). La palinología, o estudio del polen, ha sido una herramienta útil en las últimas décadas, pues los registros del tipo de vegetación de un determinado lugar, permiten inferir sus condiciones climáticas. Los datos obtenidos por Vélez *et al.* (2005) sugieren climas fríos y secos predominantes durante el último período glacial en las costas del Pacífico, al igual que estudios de Panamá y Venezuela (Fritz *et al.*, 2001; Haug *et al.*, 2001). Durante el Holoceno, las condiciones fueron más cálidas y húmedas en un principio (Holoceno temprano) y luego se volvieron más secas (Holoceno medio). Esta variación se explica por

el cambio de posición de la Zona de Convergencia Intertropical (ZCI) desde el norte hacia el sur en la región Norte de Sudamérica (Haug *et al.*, 2001) .

En las zonas montañosas como Los Andes, muchos de los hábitats existentes en el Cuaternario fueron eliminados o simplemente quedaron inhabitables conforme los glaciares fueron avanzando, alterando así la distribución de las poblaciones, que de no ser capaces de migrar, quedaron eliminadas.

Por otro lado en las zonas costeras, las áreas potencialmente habitables incrementaron conforme las condiciones climáticas mejoraron, permitiendo una expansión potencial de ciertas poblaciones desde los Andes y la Amazonía (Ruzzante *et al.*, 2008).

Wiens *et al.*, (2011) llevaron a cabo un estudio para determinar los factores responsables de los patrones de riqueza local de especies, para lo cual utilizaron especies de la familia Hylidae, por la variación en la riqueza y la increíble diversidad local en la Amazonía. El estudio demostró que la variación de la riqueza local no se explica tanto por factores climáticos, tasas de diversificación ni variación morfológica cuanto por el tiempo de colonización de cada región. De allí la importancia de conocer los factores históricos de una región en estudios que pretenden descifrar la estructura de las poblaciones que habitan en ella.

3.6. MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores genéticos se han convertido en herramientas poderosas y eficaces en la actualidad para estudios filogeográficos, sin embargo es necesario escoger de manera adecuada el tipo de marcadores a emplear. El uso de ADN nuclear o ADN mitocondrial ha sido motivo de debate por muchos investigadores. Rollins *et al.*, (2011) reconoce a éste último como el mejor marcador para trazar el origen e historia invasiva de las poblaciones, más aún si se trata de eventos relativamente recientes. Si bien el ADN mitocondrial

presenta desventajas como su neutralidad y clonalidad, los efectos de dichas características se ven reducidos cuando se trabaja con un número pequeño de generaciones (Birky, 2001; Bazin *et al.*, 2006). También presenta una serie de ventajas como el hecho de tratarse de ADN no recombinante, y que la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) es más efectiva por su alto número de copias en las células, lo que permite trabajar de mejor manera con muestras conservadas en museos y otras colecciones.

Además el uso de secuencias de ADN mitocondrial provee información valiosa para el manejo de especies invasivas, ya que permite entender la historia de la invasión, conocer el número de introducciones y realizar pruebas de expansión poblacional mediante análisis de los datos (e.g., Rollins *et al.*, 2011).

3.7. OBJETIVOS

3.7.1. General

- Determinar la localidad de origen en el continente de las poblaciones de *Scinax quinquefasciatus* establecidas en Galápagos (Isla Isabela).
- Identificar la distribución geográfica de la variabilidad genética en las poblaciones de *S. quinquefasciatus* en la costa del Ecuador continental.

3.7.2. Específicos

- Llevar a cabo análisis filogenéticos y filogeográficos de las poblaciones continentales e insulares de *S. quinquefasciatus*.
- Explorar la existencia de influencias ambientales en la llegada y establecimiento de anfibios en Galápagos.
- Obtener información útil sobre el estado de las poblaciones para el manejo de la especie introducida *S. quinquefasciatus* en el archipiélago de Galápagos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MUESTREOS POBLACIONALES

Se realizó una salida de campo para coleccionar *S. quinquefasciatus* en el archipiélago de Galápagos (Pto. Villamil, Isla Isabela) en Diciembre del 2009, además se usaron individuos coleccionados por personal del Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) en el 2003 en la misma localidad. Las muestras del continente se obtuvieron en su totalidad de los bancos de genoma de la sección de Herpetología del Museo de la PUCE (QCAZ) y del museo de Historia Natural de la Universidad de Kansas (KU). A estas últimas se les asignó un número QCAZ. En total se incluyeron 29 localidades (Anexo 1).

El número de individuos (N) fue de 53. Se trabajó únicamente con aquellos para los que se obtuvo la secuencia de todos los genes, con pocas excepciones en las que por tratarse de individuos únicos para la localidad fueron incluidos a pesar de no cumplir con dicho requisito (Anexo 8).

4.2. EXTRACCIÓN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL ADN

El ADN fue extraído a partir de tejidos de hígado preservados en etanol al 95% en el Museo de Zoología (QCAZ) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (Anexo 1). Se empleó el protocolo de fenol-cloroformo de M. Fujita (no publicado) con modificaciones realizadas por M. E. Ordoñez (Anexo 2). A partir del ADN extraído se realizó la amplificación de los segmentos de los genes mitocondriales 12S de rRNA (12S), NADH Deshidrogenasa I (ND1), Citocromo Oxidasa I (COI) y Citocromo B (CYTB) mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las amplificaciones se realizaron con un volumen final de 25 µl (2.5 µl de Buffer PCR 5X, 1.5 µl de MgCl₂ 50mM, 0.5 µl de cada primer 10µM, 0.5 µl de dNTPs 10mM, 0.25 µl de Taq polimerasa, 1

unidad de ADN y 18.25 µl de dH₂O). Para este proceso al igual que para la secuenciación se emplearon los protocolos y cebadores descritos en las Tablas 1 y 2, y estandarizados previamente en el laboratorio de Biología Molecular de la sección de Herpetología del QCAZ. Para visualizar los productos de PCR se emplearon geles de agarosa 1%. El kit de purificación ExoSap-IT (GE healthcare) se utilizó para eliminar los residuos de primer y dNTPs no incorporados. La secuenciación se llevó a cabo en la empresa Macrogen en Korea (Macrogen Inc., Seoul, Korea).

Las extracciones de ADN fueron depositadas en en banco de genoma del Museo de Zoología (QCAZ) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

4.3. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Las secuencias obtenidas con ambos cebadores (derecha y reversa) fueron ensambladas para generar una secuencia consenso de cada fragmento de ADN utilizando el programa Geneious Pro 5.3.4 (Drummond *et al.*, 2010). La alineación de las secuencias consenso se llevó a cabo con el mismo programa y una re alineación con ayuda de la aplicación MAFFT Multiple Alignment (Katoh *et al.*, 2002) y el ajuste manual de las secuencias se realizó en el programa Mesquite 2.74 (Maddison y Maddison, 2010).

Los análisis filogenéticos fueron hechos bajo los criterios de máxima parsimonia e inferencia Bayesiana. Los grupos externos empleados en el estudio fueron *Dendropsophus parviceps* y *Scinax garbei*, especies relacionadas (Faivovich *et al.*, 2005).

4.3.1. MÁXIMA PARSIMONIA

El criterio de máxima parsimonia, al igual que el de máxima verosimilitud, es un método que selecciona los árboles minimizando la cantidad de cambios evolutivos requeridos para explicar los datos. A pesar de sus limitaciones, los análisis de parsimonia

han sido muy usados desde la década de los 70 en la construcción de árboles filogenéticos (Swofford, 2003).

Este análisis se desarrolló en el programa Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP 4.0, Swofford, 2003), empleando la metodología de purga de cladogramas TBR (Bisección-Reconexión de árboles) y el algoritmo de permutación de ramas. Se implementaron 1 000 000 árboles para la búsqueda heurística, la adición fue aleatoria al árbol inicial de 100 réplicas. Para la evaluación del soporte de los nodos se empleó la técnica de bootstrap no paramétrico utilizando 500 réplicas, con búsqueda de Adición Progresiva Rápida.

4.3.2. INFERENCIA BAYESIANA

Este análisis se llevó a cabo en el programa MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck *et al.*, 2001). Las secuencias fueron divididas en 10 particiones: (1) gen 12S, (2) primera posición de los codones de ND1, (3) primera posición de los codones de CO1, (4) primera posición de los codones de CYTB, (5) segunda posición de los codones de ND1, (6) segunda posición de los codones de CO1, (7) segunda posición de los codones de CYTB, (8) tercera posición de los codones de ND1, (9) tercera posición de los codones de CO1 y (10) tercera posición de los codones de CYTB. El modelo de evolución para cada partición fue determinado utilizando el criterio de información Akaike con corrección para muestras pequeñas (AICc) del programa JmodelTest 0.1.1 (Posada, 2008) (Tabla 3).

Se corrieron dos búsquedas bayesianas independientes mediante el algoritmo de la cadena Markov de Monte Carlo con cuatro cadenas por 30.000.000 de generaciones. La convergencia de las cadenas fue verificada con el programa TRACER v1.3 (Rambaut y Drummond, 2007). Las primeras 4 500 000 generaciones fueron descartadas con una fracción de burn in = 0,15.

4.4. EVENTOS DE INVASIÓN

Para poner a prueba la monofilia de las poblaciones de Galápagos, se empleó la prueba de bootstrap paramétrico que se basa en simulaciones para replicar los datos, pero a diferencia del bootstrap no paramétrico, dichas simulaciones se hacen a partir de una topología cuyos parámetros se han establecido previamente y asumiendo que la hipótesis nula es correcta (Huelsenbeck y Crandall, 1997).

A partir del árbol constreñido se simularon secuencias de ADN bajo el modelo de evolución especificado por una búsqueda bayesiana o de máxima verosimilitud. A partir de las secuencias simuladas, en este caso se hicieron búsquedas de máxima parsimonia y los árboles obtenidos proporcionaron una distribución de datos nula con los que se comparó el valor real para aceptar o rechazar la hipótesis nula. Dicho valor real se refiere a la cuantificación de la diferencia entre la topología constreñida y la no constreñida. Normalmente el nivel de rechazo en esta prueba es del 5%, es decir, si el valor observado es mayor a los valores que se encuentran fuera del límite de la distribución y corresponde al 5% de las simulaciones, se rechaza la hipótesis nula (Huelsenbeck y Crandall, 1997).

Se realizaron tres pruebas de bootstrap paramétrico en el programa Mesquite 2.74 (Maddison y Maddison, 2010), cada una en base a un árbol filogenético constreñido obtenido en el programa Garli 2.0 (Zwickl, 2006) bajo el criterio de máxima verosimilitud. El primero forzando la monofilia de la población de Puerto Villamil con las poblaciones centro orientales de la costa ecuatoriana, el segundo forzando la monofilia de la población de Puerto Villamil y las centro occidentales de la costa ecuatoriana y el tercero forzando la monofilia de la población de Puerto Villamil. En cada una de las pruebas se simularon 100 matrices de secuencias a partir de las cuales se construyeron 100 árboles (usando el modelo de evolución GTR + G).

Se comparó el valor observado de diferencia de número de pasos entre el árbol constreñido y el árbol sin constreñir con la distribución de diferencias de los árboles derivados a partir de las matrices simuladas.

Para descartar la posibilidad de que la población de Galápagos sea producto de un evento de invasión a partir de una población con alta variabilidad, se realizó un análisis de números aleatorios para obtener una distribución de frecuencias esperadas de individuos pertenecientes a un mismo clado o a clados diferentes. Una vez obtenidas estas frecuencias se realizó una prueba de X^2 para la bondad de ajuste en el programa R 2.11.1 (R Development core team, 2008) dadas las frecuencias observadas.

4.5. EXPANSIÓN POBLACIONAL

El propósito de las pruebas de neutralidad consiste en detectar si las secuencias de ADN mitocondrial evolucionan de forma neutral, es decir de acuerdo a lo esperado por el azar o si lo hacen por un proceso no al azar, como producto de una expansión demográfica por ejemplo (Excoffier *et al.*, 2006).

En el presente estudio se realizaron dos pruebas de neutralidad utilizando el programa Arlequin 3.0 (Excoffier *et al.*, 2006). “Fs” (Fu, 1997), que es una prueba particularmente sensible al crecimiento poblacional y “D” (Tajima, 1989), ambos empleando 1 000 simulaciones. Estas pruebas son efectivas por cuanto los eventos demográficos (expansión poblacional, efecto fundador, cuello de botella) generan cambios en la diversidad genética de las poblaciones, y ambos estadísticos son sensibles a dichos cambios.

En este caso el análisis se corrió únicamente para las poblaciones continentales dado que el tiempo (demasiado corto) de la llegada de *Scinax quinquefasciatus* al

archipiélago de Galápagos, podría arrojar resultados que no necesariamente se ajusten a la realidad de dicha población.

4.6 RED DE HAPLOTIPOS

Se construyó una red de haplotipos para visualizar la diferenciación entre los haplotipos muestreados. Este análisis permite identificar grupos haplotípicos y observar el número de substituciones que los separan (Juste *et al.*, 2006). La red de haplotipos complementa los resultados obtenidos en los análisis filogenéticos. Para su elaboración se emplean únicamente los sitios informativos de las secuencias, es decir aquellas posiciones variables del ADN que diferencian a una secuencia de las demás.

Usando la matriz de secuencias de ADN de los cuatro genes empleados en el estudio (12S, ND1, CO1 y CYTB) fue posible calcular y exportar una matriz de haplotipos en el programa DnaSP v 5.10.01 (Rozas *et al.*, 2010), que posteriormente en el programa Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2006) se sometió a un análisis de diversidad de dichos haplotipos. Una vez hecho esto, la red de haplotipos fue elaborada y editada en el programa Networks 4.6.0.0 (Bandelt *et al.*, 1999) usando el algoritmo “Median-Joining” y basado en máxima Parsimonia. Los gaps en la matriz de haplotipos fueron considerados como datos faltantes para el análisis. Se excluyeron las secuencias de los grupos externos.

4.7. DIVERSIDAD GENÉTICA

Para comprender la estructura de las poblaciones continentales y comparar su diversidad genética se realizó un AMOVA (Análisis Molecular de Varianza) estándar en el programa programa Arlequin 3.0 (Excoffier *et al.*, 2006). Este análisis usa las frecuencias de haplotipos y número de mutaciones entre ellos para poner a prueba el grado de significación de los componentes de varianza asociados a varios niveles jerárquicos de estructura genética mediante un método de permutaciones no paramétrico (Excoffier *et al.*,

1992). En el caso de este estudio, los datos se estructuraron de acuerdo a los tres grupos genéticos que sugieren los análisis filogenéticos: (1) individuos del clado Norte (2) individuos del clado Centro, (3) individuos del clado Sur. Para llevar a cabo el análisis se corrieron 10 000 permutaciones.

Se calcularon las distancias genéticas dentro y entre los grupos Norte, Centro y Sur en base a los cuatro genes: 12S, ND1, CO1 y CYTB, y se calculó la distancia genética de los individuos del continente basada en el gen 12S para poder comparar con estudios similares.

4.8. FACTORES AMBIENTALES

Con el objetivo de determinar si existe relación entre las condiciones ambientales y el establecimiento de *S. quinquefasciatus*, se revisaron los datos de precipitación anual de Galápagos (Puerto Ayora), Guayaquil y los datos de colecta de *S. quinquefasciatus* en Galápagos. Los primeros datos se obtuvieron a partir de la publicación de Trueman y d'Ozouville (2010) y del Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología del Ecuador (INAMHI) entre los años 1991 y 2009, mientras que los datos de colecta se obtuvieron de la base de datos de la Estación Científica Charles Darwin.

5. RESULTADOS

5.1. RELACIONES FILOGENÉTICAS

Se obtuvieron secuencias de 53 individuos de *Scinax quinquefasciatus* de 27 localidades (Figura 1) para cuatro genes mitocondriales: 12S (~ 690 pb), ND1 (~ 968 pb), CO1 (~673 pb) y CYTB (~ 603 pb). (Anexo 1).

En la Tabla 3 se detallan los modelos de substitución empleados para cada una de las diez particiones usadas en los análisis de inferencia Bayesiana, junto con los estimados de sus parámetros.

La filogenia bajo el criterio de inferencia Bayesiana muestra la presencia de dos clados basales con buen soporte (Figura 2). El primer clado basal (A), corresponde a poblaciones de la zona Norte de la costa ecuatoriana y contiene a la mayoría de individuos de localidades de la provincia de Esmeraldas y dos individuos del norte de Manabí.

El segundo clado (B), está conformado por dos subclados: (B1) dentro del cual se encuentran especímenes colectados en localidades de la zona Sur, en las provincias El Oro y sur de Guayas y (B2) que contiene la mayoría de individuos y corresponde a la zona Centro de la Costa, de las provincias de Manabí, Guayas, Santa Elena y Los Ríos. Dentro de este clado se encuentran también los 15 especímenes colectados en Puerto Villamil (Galápagos). Estas muestras están asociadas a dos clados parapátricos, el uno con alto soporte (B2.2) y el otro con soporte bajo (B2.1). El primero, B2.2, lo conforman especímenes de localidades de la parte más oriental del Centro de la Costa y el otro, B2.1, aquellos individuos de localidades ubicadas hacia la parte más occidental.

Como se observa en la Figura 2, las muestras de Galápagos están asociadas con individuos de varias localidades continentales, todas pertenecientes al clado Centro, sin

embargo un grupo de muestras (QCAZ 23950, 23953-54, 46793, 46798 y 46800) se ubican en el subclado B2.1, mientras que otro grupo de muestras (QCAZ 23951-52, 23957-58, 46794-97 y 46799) se ubican en el subclado B2.2. Las muestras de la localidad de Babahoyo, al igual que las de Galápagos se ubican en ambos sub-clados, lo que no ocurre con ninguna otra localidad. El bajo número de muestras por localidad no nos permitió determinar la variabilidad genética intra poblacional. Sin embargo fue posible comparar las frecuencias esperada (alta) y observada (baja) de casos en los que individuos pertenecientes a una misma población presenten haplotipos diferentes que los ubiquen en clados separados (como en el caso de Babahoyo), y determinar estadísticamente que la diferencia es altamente significativa ($p=0,008$). Dichos resultados permitieron descartar la hipótesis de que la población de Galápagos fuera el producto de una sola invasión a partir de una población continental con alta variabilidad.

El análisis de parsimonia arrojó como resultado un árbol de 1 263 pasos, cuyo índice de consistencia fue de 0,845, y su índice de retención 0,838. De un total de 2 928 caracteres moleculares empleados en el análisis, 2 025 corresponden a sitios invariables (monomórficos) y 308 son parsimónicamente informativos. La topología del árbol es congruente con la del análisis Bayesiano, con la diferencia de que las ramas en el subclado B2 carecen de resolución (Figura 3).

Los bootstrap paramétricos resultaron significativos y en los tres casos se rechazó la hipótesis nula, que sostenía que la población de Galápagos, o bien era monofilética o se asociaba únicamente a uno de los dos subclados centrales. Los histogramas (Figura 4) muestran la distribución de frecuencias de la diferencia de longitud de los árboles elaborados a partir de las matrices simuladas en base a la topología constreñida para cada caso. Las líneas rojas en cada histograma corresponden a los extremos de la distribución;

los valores fuera de ellas sugieren que diferencias de longitud mayores ocurren en una frecuencia menor a 0,05.

En el caso del primer test al constreñir la población insular con las de la región centro occidental, clado B2.1 en un grupo monofilético, el árbol constreñido (de 1 263 pasos) tuvo una diferencia de dos pasos con respecto al árbol más óptimo (de 1 261 pasos). Por lo tanto la hipótesis nula puede ser rechazada con un $p < 0,05$. En el segundo caso, al constreñir la población insular con las de la región centro oriental (clado B2.2) en un grupo monofilético, la diferencia en número de pasos entre el árbol constreñido (1 272) y el mejor árbol, fue de 11 ($p < 0,05$). Por último, en el test en el que el árbol constreñido incluyó a todas las muestras de Galápagos como un grupo monofilético, el árbol constreñido tuvo 1 263 pasos, la diferencia en este caso es fue de dos respecto al mejor árbol. Este valor se encuentra en el límite de la distribución normal y también rechaza la hipótesis nula con un $p < 0,05$.

Estos resultados concuerdan y dan soporte a la topología obtenida en el análisis de inferencia Bayesiana y apoyan la hipótesis de que la introducción de *S. quinquefasciatus* podría ser producto de más de un evento de invasión.

5.2. DIVERSIDAD GENÉTICA

Al realizar el AMOVA, y comparar la diversidad entre los grupos del Norte, Centro y Sur de la costa se observa una mayor variación entre grupos (78,39%) que dentro de ellos (21,61%). La Tabla 4 resume los resultados de este análisis, que resultaron altamente significativos ($p = 0,0000$).

La matriz de distancias genéticas se obtuvo a partir de los genes 12S, ND1, CO1 y CYTB. Al calcular las distancias genéticas entre los individuos del continente (distancia p no corregida), se observan valores entre 0,03 y 3% (Anexo 9).

El rango de distancias genéticas dentro de la población de Galápagos (0,03 – 0,8%) es menor que el observado entre las muestras continentales (0,03 – 3%; Anexo 10). Pues en el continente hay distancias geográficas grandes entre las localidades de muestreo, mientras que en Galápagos se tomaron muestras de una sola localidad. El rango de divergencia entre la población insular y las poblaciones continentales también es de entre el 0,03 y 3%.

Si se toman en cuenta únicamente las muestras continentales, la menor distancia entre (0,03%) se registra entre los individuos de la provincia de Esmeraldas, al Norte de la costa, mientras que la mayor distancia (3%) se da entre los individuos de Esmeraldas con los de Los Ríos, en el centro de la costa.

La mayor divergencia genética en muestras de una misma localidad del continente corresponde a Babahoyo (Provincia Los Ríos), que se encuentra en el clado central (B2), y tiene individuos en los sub-clados B2.1 y B2.2 (entre 0,3 y 0,8%) al igual que las muestras de Galápagos.

5.3. EXPANSIÓN POBLACIONAL

Las pruebas de neutralidad que se llevaron a cabo para poner a prueba la hipótesis de expansión poblacional dieron como resultado un valor negativo en el caso del estadístico D de Tajima, para las poblaciones continentales (-0,09305), indicando la presencia de un proceso de expansión poblacional. En el caso del estadístico de Fu, se observa también un valor negativo para las poblaciones continentales (-4,67361), por lo que la conclusión es la misma que con el estadístico de Tajima.

5.4. RED DE HAPLOTIPOS

Se registraron 36 haplotipos (h) con una diversidad haplotípica (H_d) de 0,979, y una diversidad nucleotídica (P_i) de 0,03237, cuyas desviaciones estándar son de 0,010 y 0,011 respectivamente (Figura 5). La red de haplotipos concuerda con los análisis filogenéticos, pues ubica en grupos separados a los individuos del Norte, los de la zona Sur y los del Centro, divididos también en dos subgrupos. Los haplotipos de Galápagos, al igual que en los filogramas, se encuentran asociados a ambos subgrupos del centro de la Costa. En Galápagos hay cuatro haplotipos únicos (H16, H17, H18 y H19 en diez individuos; Figura 5 y Anexo 7) y uno compartido con el continente (H20 en cuatro individuos de Galápagos y dos de Guayas). El haplotipo compartido está en las localidades Milagro e Ingenio San Carlos, ambos pertenecientes a la Provincia de Guayas.

5.5. FACTORES AMBIENTALES

Los registros del establecimiento de *Scinax quinquefasciatus* en la región insular coincide con el evento del Niño en el año de 1998, durante el cual se reporta un incremento considerable en la precipitación, aproximadamente 1 853 mm más de la media anual (Trueman y d'Ozouville, 2010) (Anexo 4). Snell y Rea (1999) describen el efecto de este evento como uno de los más fuertes y dramáticos en los ecosistemas de Galápagos, junto con el de 1983. Existe también un incremento de lluvias a causa de El Niño en las estaciones calientes de los años 2002 y 2010, lo que explicaría la re-aparición de las poblaciones de *S. quinquefasciatus* de Santa Cruz y algunos reportes de San Cristóbal entre los años 2000 y 2001. En el 2008 existen también reportes de la rana en la zona alta de Santa Cruz (Bellavista), y una vez más se observa la relación con dicho factor climático (Anexos 6 y 7).

No fue posible establecer una significación estadística para la relación observada entre los datos de colecta y precipitación en Galápagos por cuanto los esfuerzos de muestreo no han sido constantes durante todos los años (Figura 6). Además, para los casos de Isabela y San Cristóbal, no fue posible emplear los datos de colectas. En el primer caso porque una vez establecidas las poblaciones en 1999, se detuvieron los muestreos, y en el segundo caso porque las poblaciones no se establecieron en San Cristóbal por lo que los únicos registros corresponden a los años 2000 y 2001.

6. DISCUSIÓN

6.1. *Scinax quinquefasciatus* EN GALÁPAGOS

Los marcadores moleculares empleados en este estudio permitieron entender de mejor manera el origen e historia de colonización de las poblaciones de *S. quinquefasciatus* en las islas Galápagos. Los análisis filogenéticos sugieren que dichas poblaciones son producto de al menos dos eventos de invasión, dado que la hipótesis de monofilia fue rechazada mediante las pruebas de bootstrap paramétrico. Se observa la asociación de las poblaciones insulares con poblaciones que forman grupos separados en el continente, el uno perteneciente a la zona centro oriental y el otro a la centro occidental de la Costa ecuatoriana.

Si bien no se conoce a ciencia cierta el medio de arribo de *S. quinquefasciatus* a Galápagos, es muy probable que se haya dado por medio de barcos, pues una de las primeras colectas de la especie, el mismo año de su introducción, fue hecha en el barco San Jacinto, en Puerto Ayora, isla Santa Cruz (Fundación Charles Darwin, 2011). Esta hipótesis es consistente con la información genética puesto que el puerto de que provienen la mayoría de embarcaciones que van a Galápagos (Guayaquil) se ubica en la parte central de la costa y está muy cercano a las poblaciones continentales más relacionadas con la población de Galápagos.

También existe un registro de colecta cerca del aeropuerto de Puerto Baquerizo Moreno, isla San Cristóbal el año 2000, sin embargo dada la cercanía de dicha localidad con el puerto de la isla, no es posible descartar la posibilidad de que se trate de un arribo por vía marítima, al igual que en el caso de Pto. Ayora.

Es posible que el arribo de un número mayor de individuos y el establecimiento de *S. quinquefasciatus* en Galápagos fuera el producto de crecimiento en las poblaciones

continentales como respuesta al fuerte evento de El Niño, que afectó también a la zona Litoral del Ecuador.

Tanto los eventos de El Niño como los efectos del cambio climático global pueden alterar la duración e intensidad de las estaciones en Galápagos al igual que la cantidad, periodicidad e intensidad de las lluvias (Trueman y d'Ozouville, 2010) como se observa en los registros meteorológicos (Anexo 5).

A pesar de que en la actualidad existen trabajos que nos proporcionan información climática del archipiélago, aún permanece la necesidad de datos de mayor amplitud espacial en las islas (Trueman y d'Ozouville, 2010), que permitan estudios más detallados y nos brinden una idea más clara de los escenarios actuales y futuros del ambiente en que se desenvuelve las especies, de manera que se pueda identificar con mayor facilidad las áreas vulnerables y tomar medidas en el manejo y control de especies invasivas.

6.2. EXPANSIÓN POBLACIONAL Y ESTRUCTURA GENÉTICA EN EL CONTINENTE

Este estudio sugiere la presencia de procesos de expansión poblacional en las poblaciones continentales de *S. quinquefasciatus*, lo cual concuerda con el estudio realizado por Milá *et al.* (2009), que usando otro taxón (*Glyphorhynchus spirurus*) cuya distribución al igual que la de esta especie, incluye la región Costa del Ecuador, proporcionó información valiosa sobre la influencia de factores históricos y geográficos en la estructura genética de las poblaciones. En este caso, Milá *et al.* (2009) asocia sus resultados con la reciente colonización de *G. spirurus* al Oeste de los Andes. La tendencia de expansión poblacional encontrada en *S. quinquefasciatus* podría asumirse también como una consecuencia de su reciente colonización en la región Litoral.

Como se demuestra en el estudio de Wiens *et al.* (2011), aquellas regiones donde las especies han permanecido más tiempo, y por lo tanto han tenido más tiempo para especiarse, es donde se encuentra la mayor riqueza y diversidad. Para afirmar que las poblaciones de *S. quinquefasciatus* de la costa ecuatoriana forman parte de este patrón, es necesaria una comparación de la diversidad intra-poblacional con una especie hermana cuya distribución se dé al Este de los Andes, en la región de la Amazonía, mientras tanto no puede descartarse la posibilidad de que la diversidad presentada y las pruebas de que actualmente experimentan un proceso de expansión poblacional no sea sino el producto de condiciones ecológicas que promueva mayor diversificación en unas zonas que en otras.

6.3. RELACIONES FILOGENÉTICAS

Los análisis filogenéticos de Máxima Parsimonia e Inferencia Bayesiana proporcionaron resultados congruentes entre sí, con buen soporte y correspondencia con la información geográfica (puntos de colecta). Los clados revelan un cierto nivel de diferenciación genética entre las localidades del continente a pesar de tratarse de individuos de la misma especie. En el caso del clado que contiene a los individuos de la región central, la división en dos grupos que muestran una tendencia oriental y occidental respectivamente, podría deberse a la presencia de factores físicos como el Río Daule, que se encuentra entre las provincias más costeras (Manabí, Santa Elena, Guayas) y la que se encuentra más hacia los Andes (Los Ríos). Esto indica la presencia de una estructura filogeográfica bien definida para *S. quinquefasciatus*, y sugiere cierto nivel de aislamiento regional.

La relación de las poblaciones de Galápagos con las poblaciones continentales resulta mucho más evidente empleando una red de haplotipos. Al identificar la diversidad haplotípica de un grupo de individuos es posible tener una idea de la diversidad genética, por supuesto, entre más información esté disponible, más confiables serán los resultados.

Fouquet *et al.* (2007) reconocen las distancias genéticas como un buen indicador preliminar de divergencia. En su estudio reportan distancias genéticas para el clado de *Scinax ruber* de entre 1,3 y 14,3% con el gen 16S. Estas distancias genéticas se deben a que el clado de *S. ruber* está conformado por varias especies. Para el caso de *S. quinquefasciatus*, las distancias genéticas en el continente fueron obtenidas para los genes ND1, CO1, 12S y CYTB, por lo que no es posible compararlas. Fouquet *et al.* (2007) sugiere que diferenciación genética $> 3\%$ con el gen 12S es característica de especies diferentes. Los valores encontrados en *S. quinquefasciatus* para el mismo gen son de 0,1 a 0,9%, como es de esperar, estos valores son menores, pues se trata de una misma especie.

Los resultados de los análisis filogenéticos sugieren que han habido al menos dos eventos de invasión desde el continente hacia Galápagos a partir de las localidades del centro de la costa ecuatoriana. Sin embargo el número de muestras tomadas por cada localidad en este estudio no es suficiente para descartar la posibilidad de que se trate de un solo evento a partir de una población con alta diversidad genética.

Los resultados de la red de haplotipos podrían deberse a que la población insular ha experimentado procesos recientes de cambio o podría tratarse de un muestreo insuficiente en las localidades continentales.

6.4. IMPLICACIONES

Tomando en cuenta que el éxito de una invasión depende, entre otros factores, de la ocurrencia de múltiples introducciones que influyen en la variación genética de la población invasora (Kolbe *et al.*, 2004), el estudio de las causas y consecuencias de eventos de invasión resulta de gran importancia, dado que además representan un alto costo biológico y económico para lugares como el archipiélago de Galápagos. Es por ello que trabajos como este, cuyo objetivo es develar información sobre los procesos de

colonización y la variabilidad genética de las poblaciones invasoras deben ser considerados al momento de tomar decisiones, plantear políticas y proyectos no sólo para la erradicación de especies introducidas sino también para los programas de prevención de nuevas invasiones (Bollmer *et al.*, 2006; Schram *et al.*, 2009).

La identificación de la historia y origen de colonización debe ser clarificada y para ello es necesario que el rango nativo sea ampliamente muestreado, en el caso de este estudio se cumple con dicho requisito, sin embargo es recomendable incluir más datos por localidad en los análisis de diversidad genética. Dichos datos proporcionarán una mejor idea de la variación intra e inter poblacional. En el caso de las poblaciones de Galápagos, hay que realizar colectas e incluir datos de las poblaciones de la isla Santa Cruz, que, al igual que Isabela se ve afectada por la invasión de *S. quinquefasciatus*.

7. LITERATURA CITADA

- Avice, J.C. 2000. Phylogeography: the history and formation of species. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Bandelt, H-J., Forster, P. y Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* Vol 16: 37-48.
- Bazin, E., Glémin, S. y Galtier, N. 2006. Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science* Vol 312: 570–572.
- Behling, H., Hooghiemstra, H. y Negret, A. J. 1998. Holocene History of the Choco' Rain Forest from Laguna Piusbi, Southern Pacific Lowlands of Colombia. *Quaternary Research*. Vol 50: 300-308.
- Birky, C.W. 2001. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annual Review of Genetics* Vol 35: 125–148.
- Bollmer, J.L., Kimball, R.T., Whiteman, N.K., Sarasola, J.H. y Parker, P.G. 2006. Phylogeography of the Galápagos hawk (*Buteo galapagoensis*): A recent arrival to the Galápagos Islands. *Molecular Phylogenetics and Evolution* Vol 39: 237-247.
- Duellman, W. E. 1971. The identities of some Ecuadorian Hylid frogs: *Hyla quinquefasciata*. *Herpetologica*, Vol 27: 213-217.
- Duellman, W.E. y Wiens, J.J. 1993. Hylid frogs of the genus *Scinax* (Wagler, 1830), in Amazonian Ecuador and Peru. *Occasional Papers of the Museum of Natural History of the University of Kansas* Vol 153: 1-57.

- Drummond A.J., Ashton B., Buxton S., Cheung M., Cooper A., Duran C., Field M., Heled J., Kearse M., Markowitz S., Moir R., Stones-Havas S., Sturrock S., Thierer T. y Wilson A. 2010. Geneious v5.3.4, Available from <http://www.geneious.com>
- Excoffier, L., Smouse, P. y Quattro, J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* Vol 131: 479-491.
- Excoffier, L., Laval, G. y Schneider, S. 2006. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* Vol 1: 47-50.
- Faivovich, J. 2002. A cladistic analysis of *Scinax* (Anura: Hylidae). *Cladistics* Vol 18: 367–393.
- Faivovich, J., Haddad, C. F., García, P., Frost, D., Campbell, J. A. y Wheeler W. C. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylineae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 294: 240.
- Fouquet, A., Vences, M., Salducci, M.D., Meyer, A., Marty, C., Blanc, M. y Gilles, A. 2007. Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species groups. *Molecular Phylogenetics and Evolution* Vol 43: 567–582.
- Fundación Charles Darwin, 2011. Charles Darwin Foundation Collection Database. [En línea] <<http://www.darwinfoundation.org/datazone/collections/eng/search/1/>> [Consultado: Junio, 2011].

- Fu, Yun-xin. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background Selection. *Genetics* Vol 147: 915-925.
- Fritz, S., Metcalfe, S., Dean, W., 2001. Holocene climatic patterns in the Americas inferred from paleolimnological records. *Interhemispheric Climate Linkages*. Academic Press. 241–263.
- Frost, D.R. 2010. *Amphibian Species of the World: an Online Reference* v. 5.4. Version 5.4 (April, 2010). Electronic database accessible at: <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/> American Museum of Natural History, New York. USA.
- Haug, G., Hughen, K., Sigman, D., Peterson, L., Rohl, U. 2001. Southward migration of the Intertropical Convergence Zone through the Holocene. *Science* Vol 293: 1304–1307.
- Huelsenbeck, J.P., y Crandall, K.A. 1997. Phylogeny estimation and hypothesis testing using Maximum Likelihood. *Annual Review of Ecology and Systematics* Vol 28: 437–466.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., Nielsen, R. y Bollback, J.P. 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* Vol 294: 2310-2314.
- INAMHI. 2011. Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología del Ecuador. En: <http://www.inamhi.gov.ec/html/inicio.htm>.
- Jiménez-Uzcátegui, G., Carrión, V., Zabala, J., Buitrón, P. y Milstead, B. 2007. Fundación Charles Darwin & Parque Nacional Galápagos. Aspectos sobre Biodiversidad y recursos biofísicos: estado de los vertebrados introducidos en Galápagos. Informe Galápagos 2006-2007. 139-145.

- Juste, J., Genovart, M., Oro, D., Bertorelle, G., Louzao, M., Forero, M.G. y Igual, J.M. 2006. Identidad y estructura genética de la pardela balear (*Puffinus mauretanicus*). *Proyectos de investigación en parques nacionales* 1: 209-223.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., y Miyata, T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acid Research* Vol 30: 3059-3066.
- Kolbe, J. J., Glor, R. E., Rodríguez, L., Chamizo, A., Larson, A., y Losos, J.B. 2004. Genetic variation increases during biological invasión by a Cuban lizard. *Nature* Vol 431: 177-181.
- Lomolino, M.V., Sax, D.F. y Brown, J.H. 2004. *Foundations of Biogeography Classic Papers with Commentaries*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois.
- Maddison, W.P. y Maddison, D.R. 2010. Mesquite: A modular system for evolutionary analysis. Version 2.74. <http://mesquiteproject.org>
- Mahoney, M. 2004. Molecular systematics and phylogeography of the Plethodon elongates species group: combining phylogenetic and population genetic methods to investigate species history. *Molecular Ecology* Vol 13: 149-166.
- Milá, B., Wayne, R.K., Fitze, P. Y Smith, T.B. 2009. Divergence with gene flow and fine-scale phylogeographical structure in the wedge-billed woodcreeper, *Glyphorynchus spirurus*, a Neotropical rainforest bird. *Molecular Ecology* Vol 18: 2979–2995.
- Parent, C.E., Caccone, A. y Petren, K. 2008. Colonization and diversification of Galápagos terrestrial fauna: a phylogenetic and biogeographical synthesis. *The Royal Society* Vol 363: 3347–3361.

- Parque Nacional Galápagos, 2009. Dirección del Parque Nacional Galápagos. Control y erradicación de animales introducidos. [En línea] <<http://www.galapagospark.org/>> [Consultado: Diciembre, 2009].
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* Vol 25: 1253-1256.
- Rambaut, A. y Drummond, A.J. 2007. Tracer v 1.4. Disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>.
- Riddle, B.R. 1996. The molecular phylogeographic bridge between deep and shallow history in continental biotas. *Trends in Ecology and Evolution* Vol 11: 207–211.
- Rogers, A. R. y Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic distances. *Molecular Biology and Evolution* Vol 9: 552–569.
- Rollins, L. A., Woolnough, A.P., Sinclair, R., Mooney, N. J. y Sherwin, W. B. 2011. Mitochondrial DNA offers unique insights into invasion history of the common starling. *Molecular Ecology* Vol 20: 2307–2317.
- Ron, S. R., Guayasamin, J.M. y Menéndez-Guerrero, P. 2011. Biodiversity and Conservation Status of Ecuadorian Amphibians. En: Heatwole, H, C. L. Barrio-Amoros, H. W. Wilkinson. *Amphibian Biology*, Vol 9 (2): 129-170.
- Rozas, J., Librado, P., Sánchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X. y Rozas, R. 2010. DnaSP v5.10.01: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* Vol 25: 1451-1452.
- Ruzzante, D.E., Walde, S.J., Gosse, J.C., Cussac, V.E., Habit, E., Zemplak, T.S. y Adams, E.D.M. 2008. Climate control on ancestral population dynamics: insight from Patagonian fish phylogeography. *Molecular Ecology* Vol 17: 2234-2244.

- Ruzzante, D.E. y Rabassa, J. 2011. Palaeogeography and palaeoclimatology of Patagonia: effects on Biodiversity. *Biological Journal of the Linnean Society* Vol 103: 221-228
- Schram, Y., Mesnick, S.L., de la Rosa, J., Palacios, D.M., Lowry, M.S., Aurióles-Gamboa, D., Snell, H.M. y Escorza-Treviño, S. 2009. Phylogeography of California and Galápagos sea lions and population structure within the California sea lion. *Marine Biology* Vol 156: 1375-1378
- Snell, H. y Rea, S. 1999. The 1997–1998 El Niño in Galápagos: can 34 years of data estimate 120 years of pattern? *Noticias de Galápagos* Vol 60: 11–20.
- Swofford, D. L. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, United States of America.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* Vol 123: 585-595.
- Trueman, M. y d'Ozouville, N. 2010. Characterizing the Galapagos terrestrial climate in the face of global climate change. *Galapagos Research* Vol 67: 26-37.
- UICN. 2009. Red List of Threatened Species. *Scinax quinquemaculatus*. Taxonomy, Habitat and Ecology. [En línea] <<http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/55990/0>> [Consultado: Diciembre, 2009].
- Vélez, M.I., Wille, M., Hooghiemstra, H., Metcalfe, S., Vandenberghe, J. y van der Borg, K. 2001. Late Holocene environmental history of southern Chocó region, Pacific Colombia; sediment, diatom and pollen analysis of core El Caimito. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* Vol 173: 197–214.

- Vélez, M.I., Hooghiemstra, H., Metcalfe, S., Wille, M. y Berrío, J.C. 2006. Late Glacial and Holocene environmental and climatic changes from a limnological transect through Colombia, northern South America. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* Vol 234: 81–96.
- Wiens, J.J. y Reeder, T.W. 1995. Combining data sets with different numbers of taxa for phylogenetic analysis. *Systematic Biology* Vol 44: 548–558.
- Wiens, J.J., Pyron, R.A. y Moen, D.S. 2011. Phylogenetic origins of local-scale diversity patterns and the causes of Amazonian megadiversity. *Ecology Letters* 1-9.
- Zwickl, D. J., 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin.

8. FIGURAS

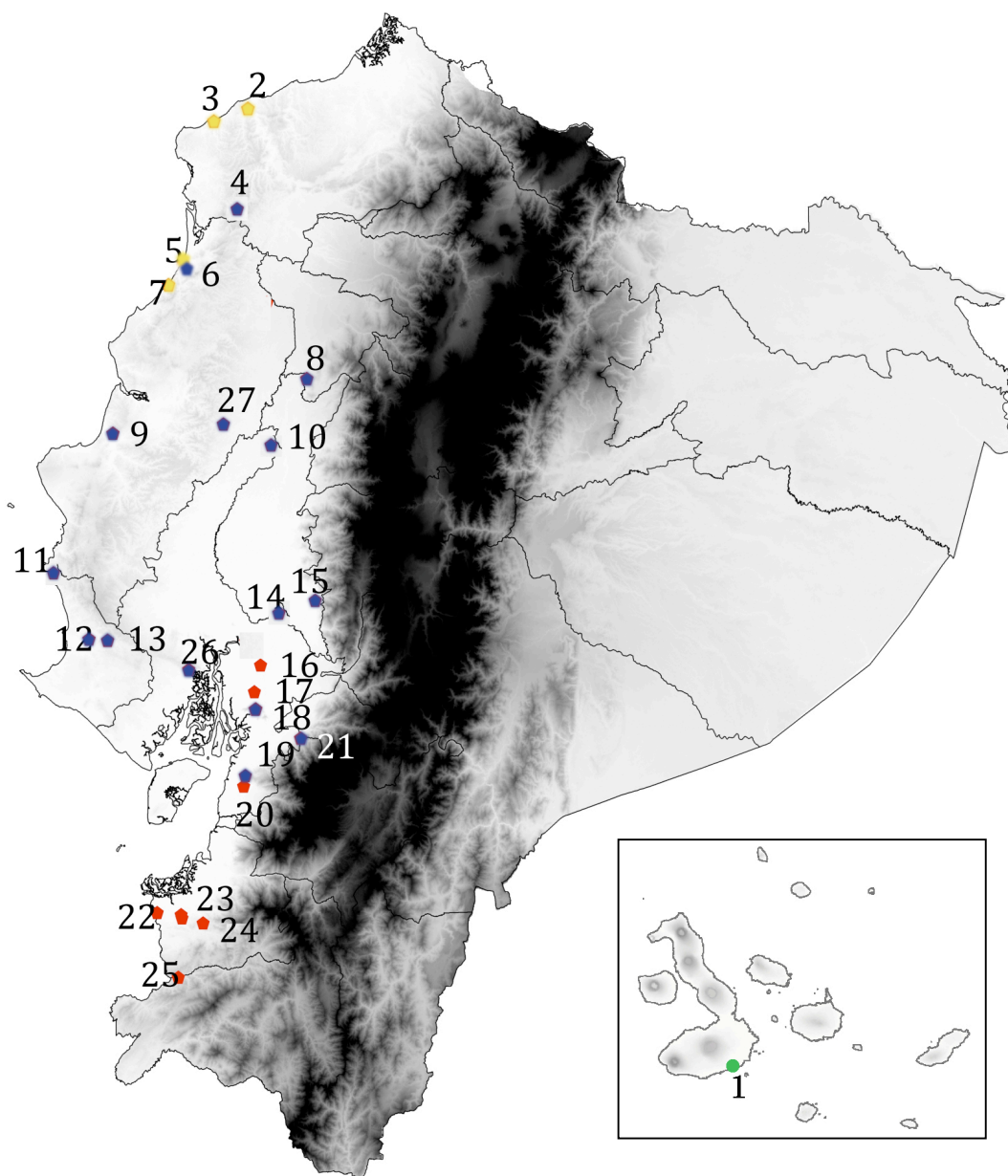


Figura 1. Mapa de localidades de los individuos empleados en este estudio, los círculos de color rojo corresponden a las localidades de muestreo de *S. quinquefasciatus* en las regiones Costa y Galápagos. Los números indican la Localidad asociada al Anexo 1 y los colores corresponden a los clados de la filogenia (Figuras 2 y 3).

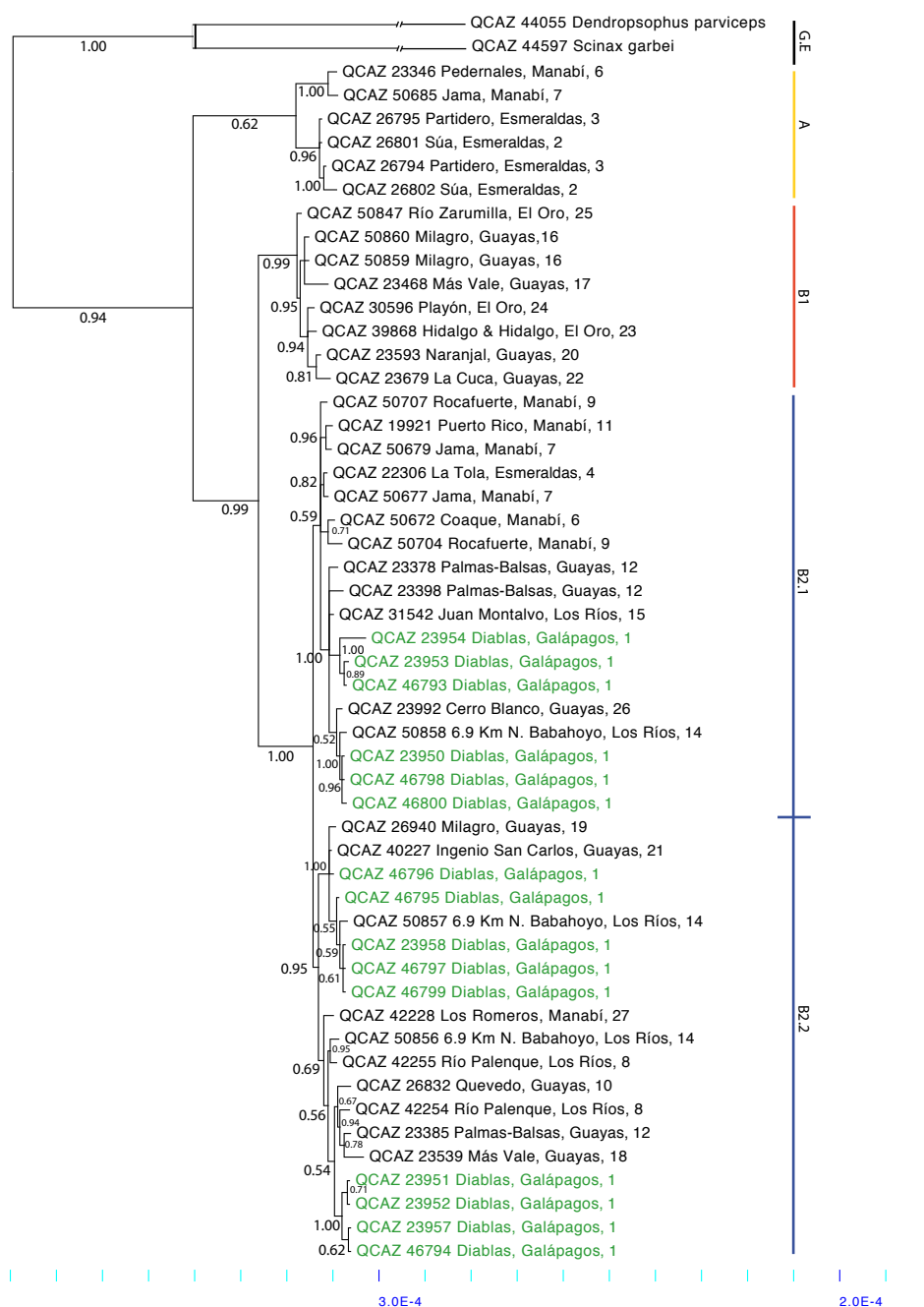


Figura 2. Filograma resultante del análisis bajo el criterio de Inferencia Bayesiana de los genes 12S, ND1, CO1 y CYTB. Se muestra el número QCAZ, de cada individuo y su localidad. En las ramas se encuentra el valor de la probabilidad posterior y en la parte inferior, la escala para la longitud de las ramas en sustituciones por sitio. Las barras laterales indican (de arriba hacia abajo) : el grupo externo (G.E), el clado Norte (A), clado Sur (B1) y clado Centro (formado por los subclados B2.1 y B2.2). Las muestras de Galápagos se indican con letras verdes. Los números corresponden a la localidad a la que pertenece cada individuo (Anexo1).

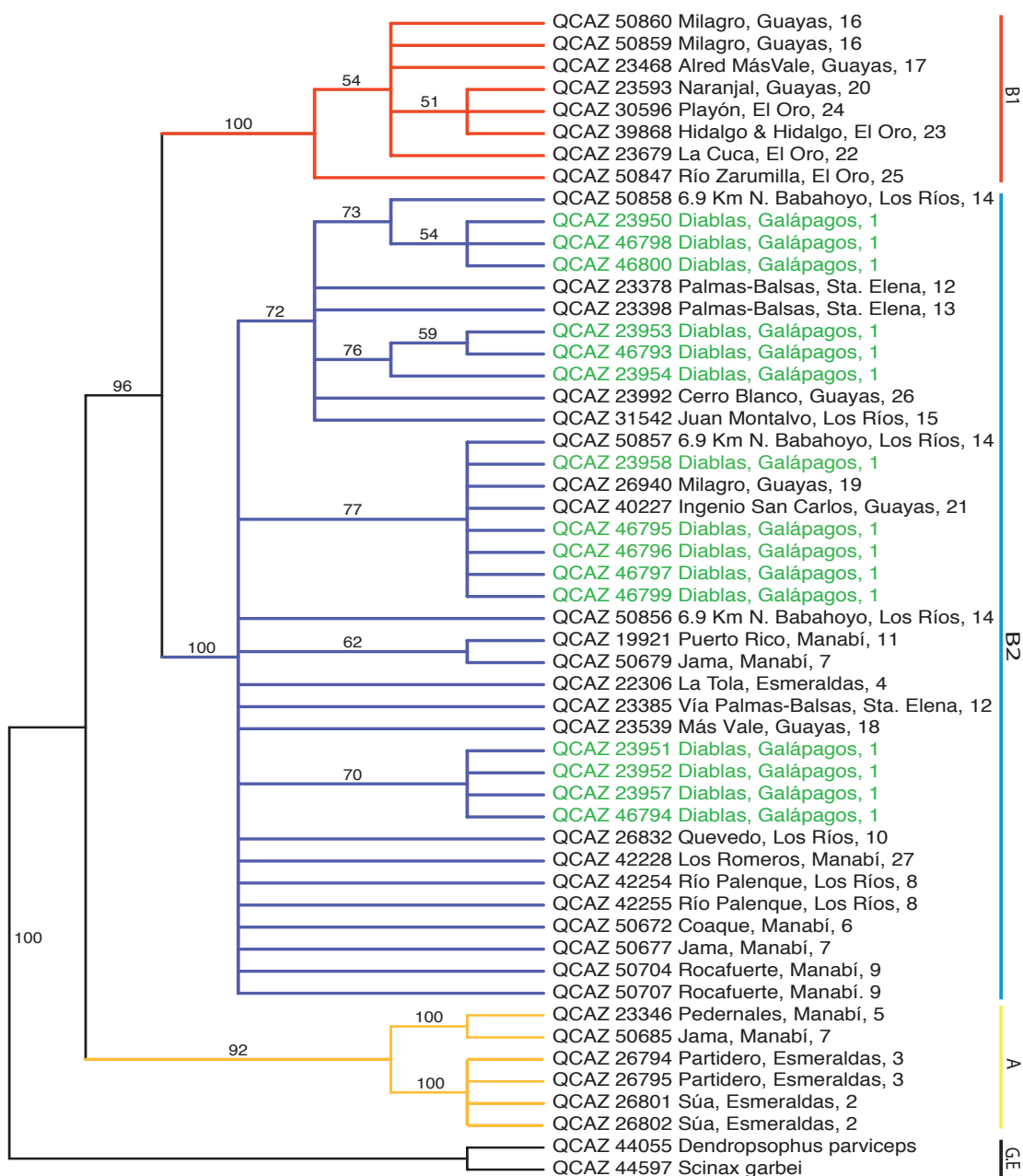


Figura 3. Árbol consenso (regla de mayoría al 50%) producto del análisis bajo el criterio de Máxima Parsimonia para los genes 12S, ND1, CO1 y CYTB, se muestran los números QCAZ para cada espécimen separados por una coma de la localidad a la que perteneces, y sobre las ramas, el valor de soporte o bootstrap. Las barras laterales indican (de arriba hacia abajo) : el clado Sur (B1), clado Centro (B2), clado Norte (A), y el grupo externo (G.E). La muestras de Galápagos se indican con letras verdes. Los números corresponden a la localidad a la que pertenece cada individuo (Anexo1).

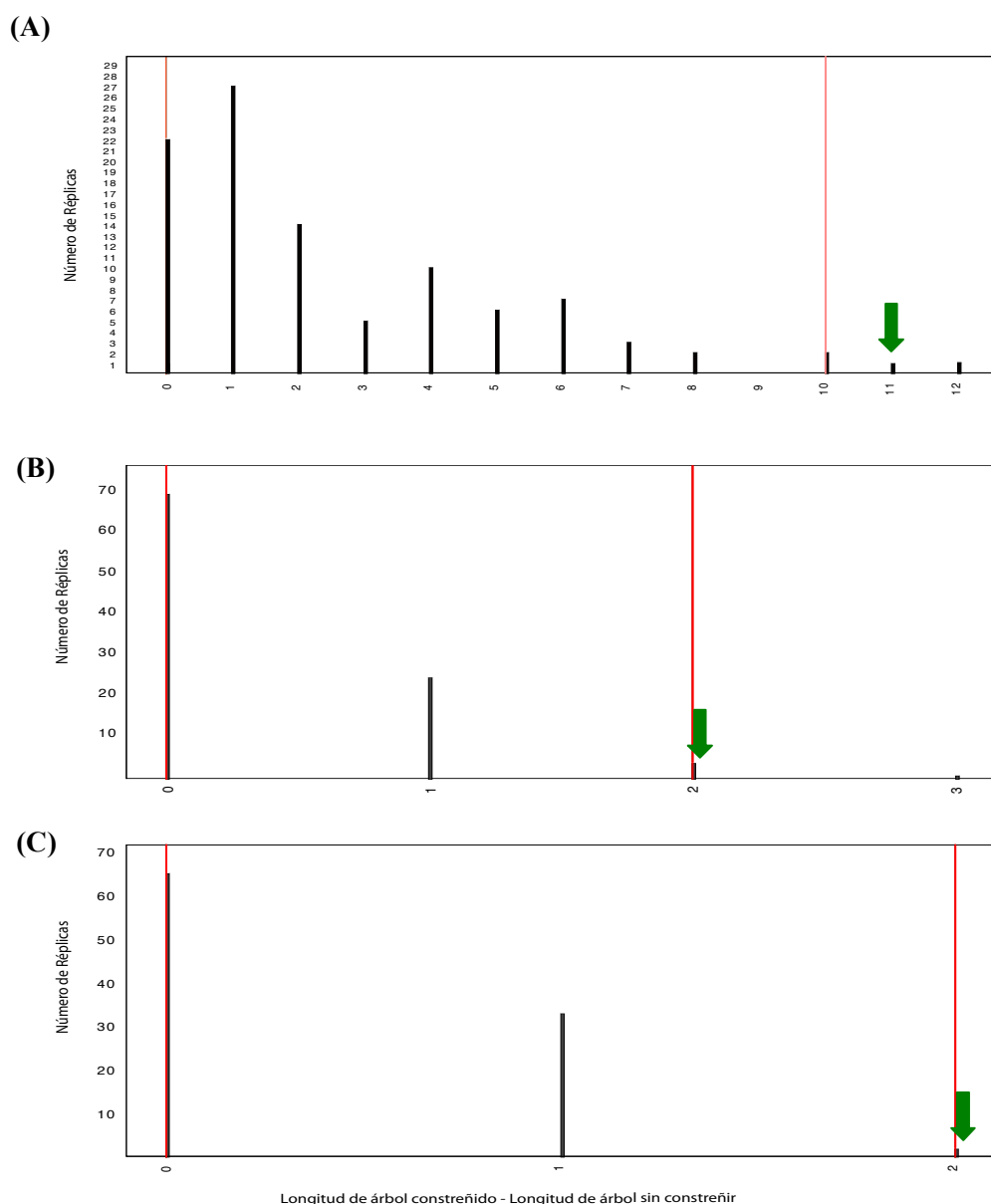


Figura 4. Histograma de la distribución de la diferencia de longitudes de árbol, producto de la simulación de 100 matrices mediante un análisis de bootstrap paramétrico. Las líneas rojas marcan los extremos de la distribución con un percentil de 0.05. Las matrices simuladas están hechas a partir de : (A) un árbol que constriñe a la población de Galápagos con las poblaciones del clado centro-oriental B2.2 ; (B) un árbol que constriñe la población de Galápagos con las poblaciones del clado centro-occidental B2.1. y (C) un árbol que constriñe a la población de Galápagos como un solo grupo monofilético. Las flechas verdes señalan los valores reales de la diferencia entre el árbol más óptimo para cada caso y el árbol constreñido respectivo.

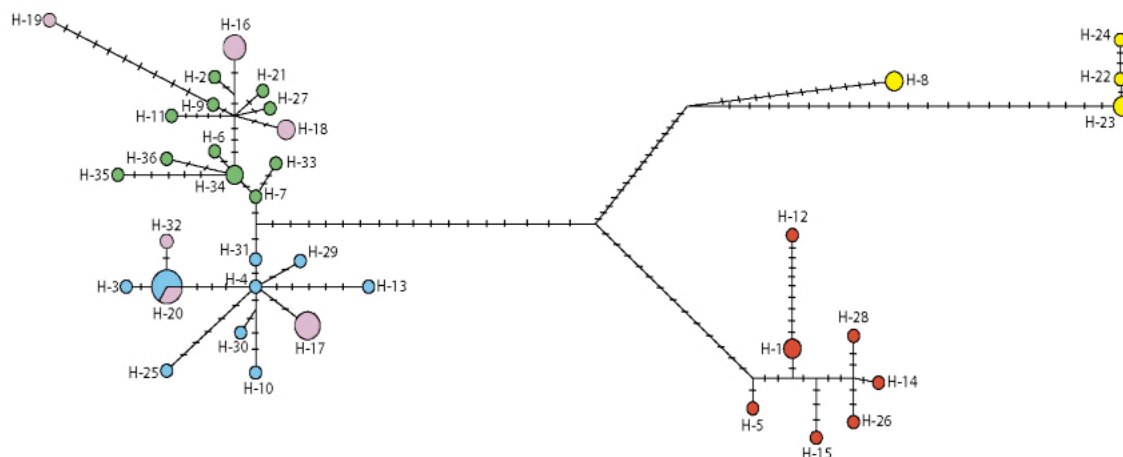


Figura 5. Rede de haplotipos en base a los caracteres informativos (variables) de las secuencias conjuntas de los genes 12S, ND1, CO1 y CYTB. Los números corresponden al número de haplotipo mostrado en el Anexo 9. Los colores amarillo y rojo representan a los haplotipos de los clados A y B1 respectivamente (Figura 2), verde y azul pertenecen al clado B2; y rosado corresponde a los haplotipos de individuos de Galápagos. Las figuras (círculos) representan a los haplotipos existentes y el tamaño de las figuras es proporcional al número de individuos que poseen dicha secuencia. Cada paso en la red, que separa un haplotipo de otro, representa un cambio entre las secuencias de los mismos y está representado por las líneas que cortan las ramas entre un haplotipo y otro.

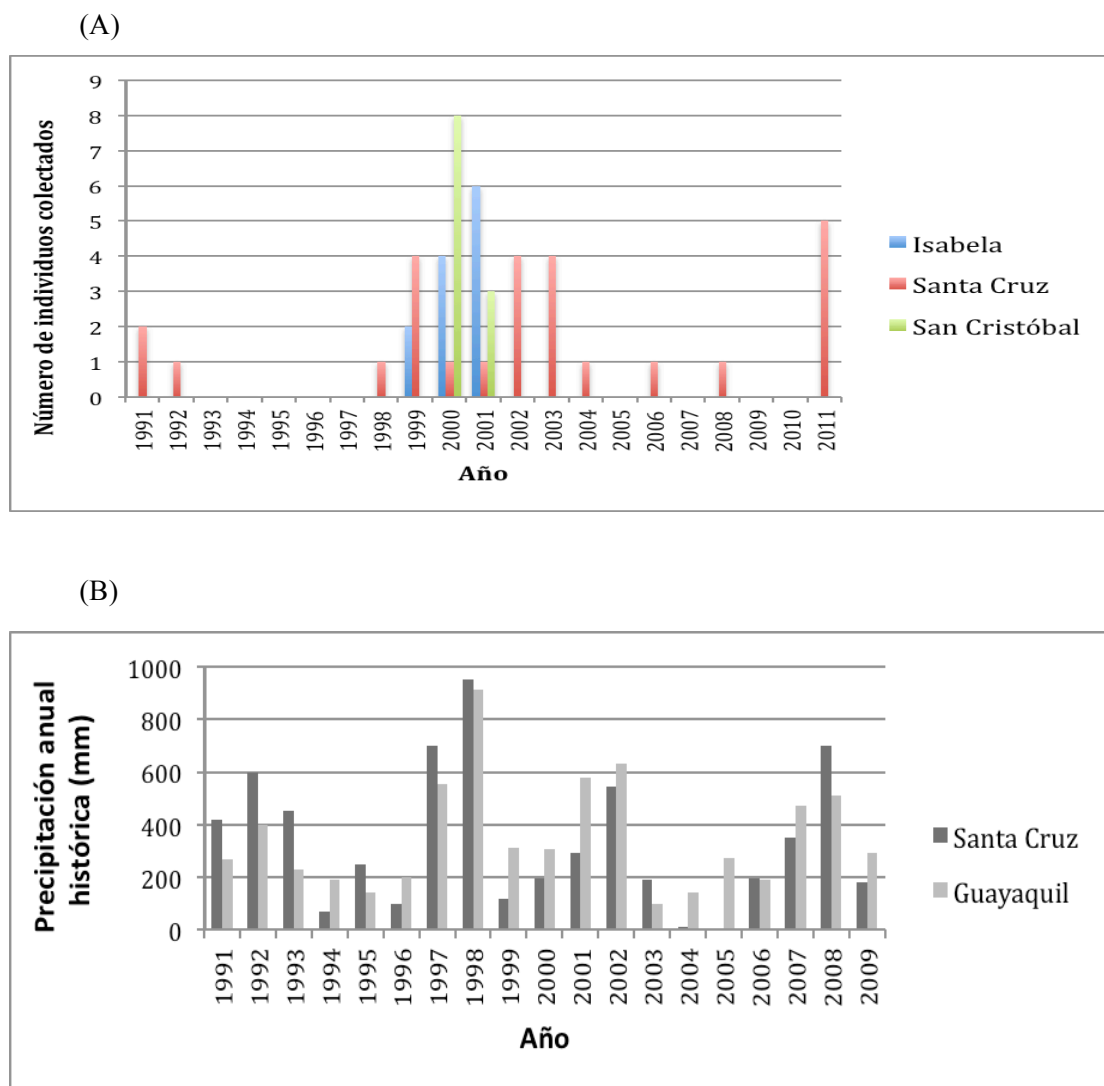


Figura 6. (A) Datos de colecta de *S. quinquefasciatus* en las islas Galápagos, obtenidos de la base de datos de la Estación Científica Charles Darwin. Las colectas de Isabela (barras azules) se detienen en el 2001, una vez comprobado el establecimiento de las poblaciones allí. (B) datos de precipitación entre 1991 y 2009 en las islas Galápagos (barra gris oscuro) y en Guayaquil (barra gris claro).

9. TABLAS

Tabla 1. Regiones de ADN y cebadores utilizados en este estudio.

Gen	Cebadores	Secuencia 5'-3'	Fuente	Dirección
12S Mitochondrial	MVZ50	TCTCGGTGTAAGCGAGAGGCTT	Graybeal, 1997	Derecha
	MVZ59	ATAGCACTGAAAAYGCTDAGATG	Graybeal, 1997	Reversa
	12H46E	GCTGCACYTTGACCTGACGT	Heinicke <i>et al.</i> , 2007	Reversa
NDI Mitochondrial	WL384	GAGATWGTGTTGWGCAACTGCTCG	Moen and Wiens, 2008	Derecha
	WL379	GCAATAATYATYTGAACMCC	Moen and Wiens, 2008	Reversa
	16S_frog	TTACCCTRGGGATAACAGCGCAA	Wiens <i>et al.</i> , 2005	Derecha
	tMET_frog	TTGGGGTATGGGCCCAAAGCT	Wiens <i>et al.</i> , 2005	Reversa
COI Mitochondrial	dgLCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGAYA	Folmer <i>et al.</i> , 1994	Derecha
	dgHCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAR	Folmer <i>et al.</i> , 1994	Reversa
	HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Folmer <i>et al.</i> , 1994	Reversa

Tabla 1. Continuación.

Gen	Cebadores	Secuencia 5'-3'	Fuente	Dirección
CYTB Mitochondrial	MVZ15	GAACTAATGGCCACACWWTACGNAA	Moritz <i>et al.</i> , 1992	Derecha
	MVZ16	GGCAAATAGGAAGTATCATTCTG	Moritz <i>et al.</i> , 1992	Reversa
	LeptoCBF2	ATTGCMCAAATYGCYACAGG	A. Fouquet, con. pers.	Derecha

Tabla 2. Protocolos de amplificación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de los genes 12S, ND1, CO1 y CYTB.

Gen	Protocolo
12S Mitochondrial	1 ciclo: 2min 94°C, 30s 50°C, 1min 72°C
	9 ciclos: 30s 94°C, 30s 50°C, 1min 72°C
	30 ciclos: 30s 94°C, 30s 52°C, 1min 72°C
	1 ciclo: 5min 72°C
ND1 Mitochondrial	1 ciclo: 2min 94°C, 30s 50°C, 1min 72°C
	10 ciclos: 30s 94°C, 30s 50°C, 1min 72°C
	29 ciclos: 30s 94°C, 30s 58°C, 1min 72°C
	1 ciclo: 5min 72°C
CO1 Mitochondrial	1 ciclo: 2min 94°C, 30s 50°C, 1min 72°C
	10 ciclos: 30s 94°C, 30s 50°C, 1min 72°C
	29 ciclos: 30s 94°C, 30s 58°C, 1min 72°C
	1 ciclo: 5min 72°C
CYTB Mitochondrial	1 ciclo: 2min 94°C
	30 ciclos: 30s 94°C, 45s 52°C
	1 ciclo: 10min 72°C

Tabla 3. Modelos de evolución seleccionados para cada partición en los análisis filogenéticos con el programa jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008). Para los genes ND1, CO1 y CYTB se presentan los modelos para cada una de las tres posiciones en el codón. El valor AICc corresponde al Criterio de Información Akaika con corrección para muestras pequeñas.

Gen	Posición en el codón	Partición	Esquema de sustitución	Modelo de evolución	Valor AICc	Frecuencia			
						A	T	G	C
12S	-	1	3	GTR+G	4139,1647	0,3127	0,2154	0,1836	0,2883
ND1	1	2	3	SYM+I	2422,7315	0,2798	0,2413	0,2175	0,2614
	2	5	3	HKY+I	1747,0324	0,1815	0,4039	0,1063	0,3083
	3	8	3	GTR+I	3834,5554	0,3548	0,2632	0,0615	0,3205
CO1	1	3	3	K80	1213,9445	0,2374	0,2157	0,2821	0,2648
	2	6	3	JC*	-	-	-	-	-
	3	9	3	HKY+G	2660,9445	0,2822	0,2682	0,1218	0,3278
CYTB	1	4	3	K80	2275,4834	0,2775	0,2867	0,175	0,2608
	2	7	3	JC	2028,6712	0,2208	0,3374	0,1868	0,255
	3	10	3	HKY	3522,4004	0,2815	0,2899	0,0916	0,3369

* Para la partición 6 (segundas posiciones en el codón del gen CO1), se empleó el modelo Jukes Cantor, por cuanto los datos no permitieron calcular un modelo de evolución específico.

Tabla 4. Resultado del AMOVA para las poblaciones continentales e insulares.

Fuente de Variación	d.f.	Suma de cuadrados	Componentes de Varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	2	387.283	17.02532 Va	78.39
Dentro de poblaciones	48	222.305	4.69386 Vb	21.61
Total	50	612.588	21.71918	
Índice de fijación	FST:	0.78388		
	P :	0.00000 **		

** Altamente Significativo

10. ANEXOS

Anexo 1. Lista de individuos empleados en el estudio. Se muestra el número de colección (QCAZ), nombre de la Localidad y Provincia en la que fueron colectados, las coordenadas de las mismas y el número de localidad que se muestra en la Figura 1.

QCAZ	Localidad	Provincia	Coordenadas		NL	Altitud (msnm)
			Latitud	Longitud		
23950	Puerto Villamil, Poza las Diablas	Galápagos	-0,950950	-90,978200	1	5
23951	Puerto Villamil, Poza las Diablas	Galápagos	-0,950950	-90,978200	1	5
23952	Puerto Villamil, Poza las Diablas	Galápagos	-0,950950	-90,978200	1	5
23953	Puerto Villamil, Poza las Diablas	Galápagos	-0,950950	-90,978200	1	5
23954	Puerto Villamil, Poza las Diablas	Galápagos	-0,950950	-90,978200	1	5
23957	Puerto Villamil, Poza las Diablas	Galápagos	-0,950950	-90,978200	1	5
23958	Puerto Villamil, Poza las Diablas	Galápagos	-0,950950	-90,978200	1	5
46793	Puerto Villamil, Poza las Diablas	Galápagos	-0,950950	-90,978200	1	5
46794	Puerto Villamil, Poza las Diablas	Galápagos	-0,950950	-90,978200	1	5

Anexo 1. Continuación.

QCAZ	Localidad	Provincia	Coordenadas		NL	Altitud (msnm)
			Latitud	Longitud		
46795	Puerto Villamil, Poza las Diablas	Galápagos	-0,950950	-90,978200	1	5
46796	Puerto Villamil, Poza las Diablas	Galápagos	-0,950950	-90,978200	1	5
46797	Puerto Villamil, Poza las Diablas	Galápagos	-0,950950	-90,978200	1	5
46798	Puerto Villamil, Poza las Diablas	Galápagos	-0,950950	-90,978200	1	5
46799	Puerto Villamil, Poza las Diablas	Galápagos	-0,950950	-90,978200	1	5
46800	Puerto Villamil, Poza las Diablas	Galápagos	-0,950950	-90,978200	1	5
26801	Súa.	Esmeraldas	0,858960	-79,875520	2	1
26802	Súa.	Esmeraldas	0,858960	-79,875520	2	1
26794	1 Km. S del partidero de Esmeraldas. Recorrido Atacames.	Esmeraldas	0,881870	-79,812520	3	10
26795	1 Km. S del partidero de Esmeraldas. Recorrido Atacames.	Esmeraldas	0,881870	-79,812520	3	10
22306	La Tola	Esmeraldas	0,404166	-79,911388	4	31

Anexo 1. Continuación.

QCAZ	Localidad	Provincia	Coordenadas		NL	Altitud (msnm)
			Latitud	Longitud		
23346	20 km E de Pedernales, vía El Carmen.	Esmeraldas	0,083060	-80,050000	5	300
50672	Río Coaque	Manabí	0,05012	-80,0388	6	33
50685	Entre Río Coaque y Jama	Manabí	-0,04646	-80,14004	7	1
50677	Entre Río Coaque y Jama	Manabí	0,05666	-80,05844	7	5
50679	Entre Río Coaque y Jama	Manabí	0,05666	-80,05844	7	5
42254	Centro Científico Río Palenque	Los Ríos	-0,550000	-79,366666	8	N.D
42255	Centro Científico Río Palenque	Los Ríos	-0,550000	-79,366666	8	N.D
50707	5 Km N de Rocafuerte, San Andrés de Rocafuerte	Manabí	-0,86822	-80,46363	9	334
50704	5 Km N de Rocafuerte, San Andrés de Rocafuerte	Manabí	-0,86822	-80,46363	9	334
26832	Pocos km. al este de Quevedo. Vía a El Empalme.	Los Ríos	-1,064200	-79,491790	10	64
19921	Puerto Rico	Manabí	-1,616700	-80,833300	11	10

Anexo1. Continuación

QCAZ	Localidad	Provincia	Coordenadas		NL	Altitud (msnm)
			Latitud	Longitud		
23378	Las Palmas-Balsas	Santa Elena	-2,016600	-80,496100	12	90
23385	Las Palmas-Balsas	Santa Elena	-2,016600	-80,496100	12	90
23398	Vía Las Palmas-Balsas	Santa Elena	-2,007900	-80,603700	13	50
50858	6,9 Km al Norte de Babahoyo	Los Ríos	-1,816700	-79,516700	14	1
50857	6,9 Km al Norte de Babahoyo	Los Ríos	-1,816700	-79,516700	14	1
50856	6,9 Km al Norte de Babahoyo	Los Ríos	-1,816700	-79,516700	14	1
31542	Juan Montalvo, Orillas del río Cristal	Los Ríos	-1,794033	-79,284333	15	65
50860	11.7 km S Milagro	Guayas	-2,153070	-79,602790	16	22
50859	11.7 km S Milagro	Guayas	-2,153070	-79,602790	16	22
23468	Alrededores de la estación Cerro Más Vale.	Guayas	-2,398600	-79,633500	17	26
	Entre Cerro Más Vale y Virgen de Fátima.					
23539	Aproximadamente 11Km al N de Más Vale por la carretera.	Guayas	-2,300310	-79,638890	18	40

Anexo 1. Continuación

QCAZ	Localidad	Provincia	Coordenadas		NL	Altitud (msnm)
			Latitud	Longitud		
26940	1 Km. S. de Milagro en la vía a Naranjal.	Guayas	-2,153070	-79,602790	19	7
23593	Aproximadamente a 15Km de Naranjal, en la carretera hacia Machala.	Guayas	-2,765850	-79,691800	20	26
40227	Marcelino Maridueña, Ingenio San Carlos	Guayas	-3,070759	-77,469462	21	32
23679	Recorrido desde Huaquillas a La Cuca. Arenillas.	El Oro	-3,535700	-80,067130	22	53
39868	Campamento de Hidalgo & Hidalgo a 3 km de Huaquillas en vía Arenillas-Huaquillas a 1 km de la carretera	El Oro	-3,523680	-30,206940	23	23
30596	Carretera La Avanzada-Playón.	El Oro	-3,652777	-79,803888	24	230
50847	Río Zarumilla	El Oro	-3,88192	-80,08306	25	N.D
23992	Bosque Protector Cerro Blanco, Guardianía Caseta Pigío.	Guayas	-3,881920	-80,083060	26	300
42228	Descaso de los Romero, cerca del cementerio	Manabí	-0,817280	-79,819920	27	N.D
44055	Río Napo, entrada a La Selva lodge, Banco Norte	Sucumbíos	-0,508680	-76,364930	-	229
28003	Zábalo, familia Criollo	Sucumbíos	-0,318133	-75,766250	-	220

Anexo 1. Continuación

QCAZ	Localidad	Provincia	Coordenadas		NL	Altitud (msnm)
			Latitud	Longitud		
44597	Río Napo, Huiririma, Banco Sur	Fco. De Orellana	-0,711630	-75,62395	-	194

Anexo 2. Protocolo de extracción de ADN usando Tiocinato de Guanidina

MÉTODOLOGÍA

Lisis celular

1. Calentar la solución de lisis a 55°C hasta que el precipitado vuelva a estar en solución.
2. Colocar 10 mg de tejido macerado en un tubo de 1.5ml que contenga 300µl de la solución de lisis de células.
3. Añadir 3-5µl e proteinasa K (20mg/ml), dar un vórtex rápido e incubar de 3-6 horas (dejarlo durante toda la noche si fuera necesario) a 55°C hasta que el tejido se haya digerido.
4. Durante el proceso de lisis, las muestras deben ser agitadas por lo menos cada 30 minutos.
5. Dar un vórtex suave para homogenizar.
6. Enfriar las muestras a temperatura ambiente.

Precipitación proteica

1. Añadir 100µl de Solución de precipitación de proteínas en cada tubo con células lisadas y dar un vórtex de 10-20 segundos para mezclar el contenido.
2. Centrifugar a una velocidad de 13.000 rpm durante 10 minutos.
3. Trasladar el sobrenadante, que contiene ADN a un tubo nuevo de 1.5ml previamente rotulado. El pellet formado en el fondo del tubo contiene proteínas y es descartado.

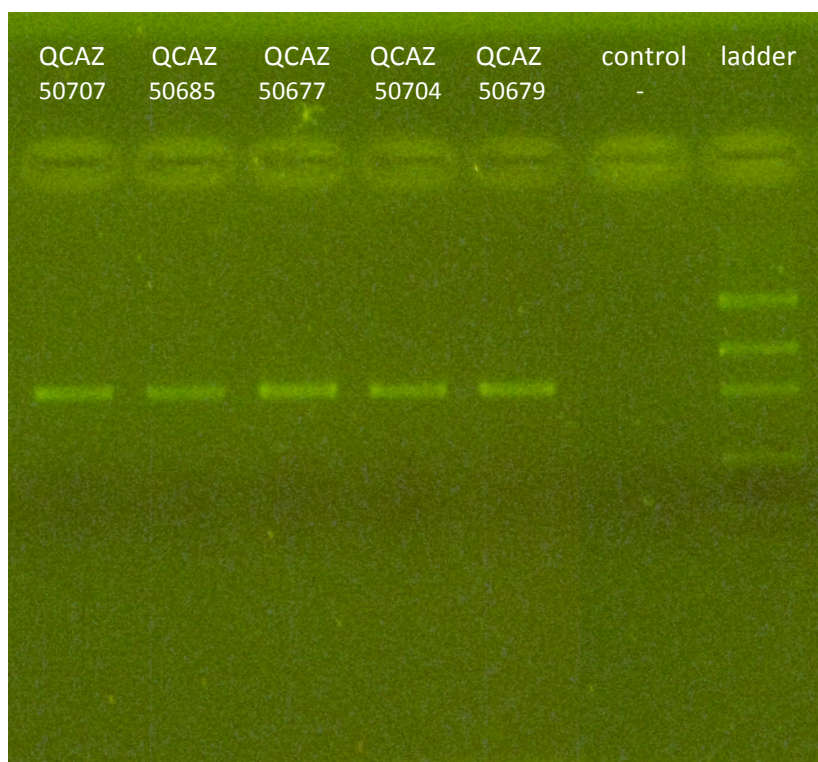
Precipitación de ADN

1. Añadir 300µl de Isopropanol frío (-20°C) y mezclarlo invirtiendo el tubo varias veces.
2. Centrifugar a una velocidad de 13.000 rpm durante 10 minutos.
3. Descartar el sobrenadante con mucho cuidado para no perder el pellet, que en este caso contiene el ADN.
4. Añadir 300µl de etanol 70% e invertir varias veces el tubo para lavar el pellet de ADN.
5. Centrifugar a una velocidad de 13.000 rpm durante 10 minutos.
6. Descartar una vez más el sobrenadante.
7. Para evitar los residuos de etanol en el tubo, dejarlo con la tapa abierta durante una hora aproximadamente de manera que se evapore, teniendo cuidado de que el pellet no se deshidrate demasiado.

Hidratación de ADN y almacenamiento

1. Añadir 50µl de 10mM TrisCl, pH 8.0, Resuspender el ADN dando golpes suaves a la base del tubo.
2. Almacenar hasta el día siguiente a -20°C.

Anexo 3. Productos de amplificación de PCR para el gen 12S corridos en gel de Agarosa 1% y teñida con SYBRSAFE, se muestran los números de colección (QCAZ) correspondientes a la muestra de cada pocillo, y al extremo derecho la escalera (ladder).

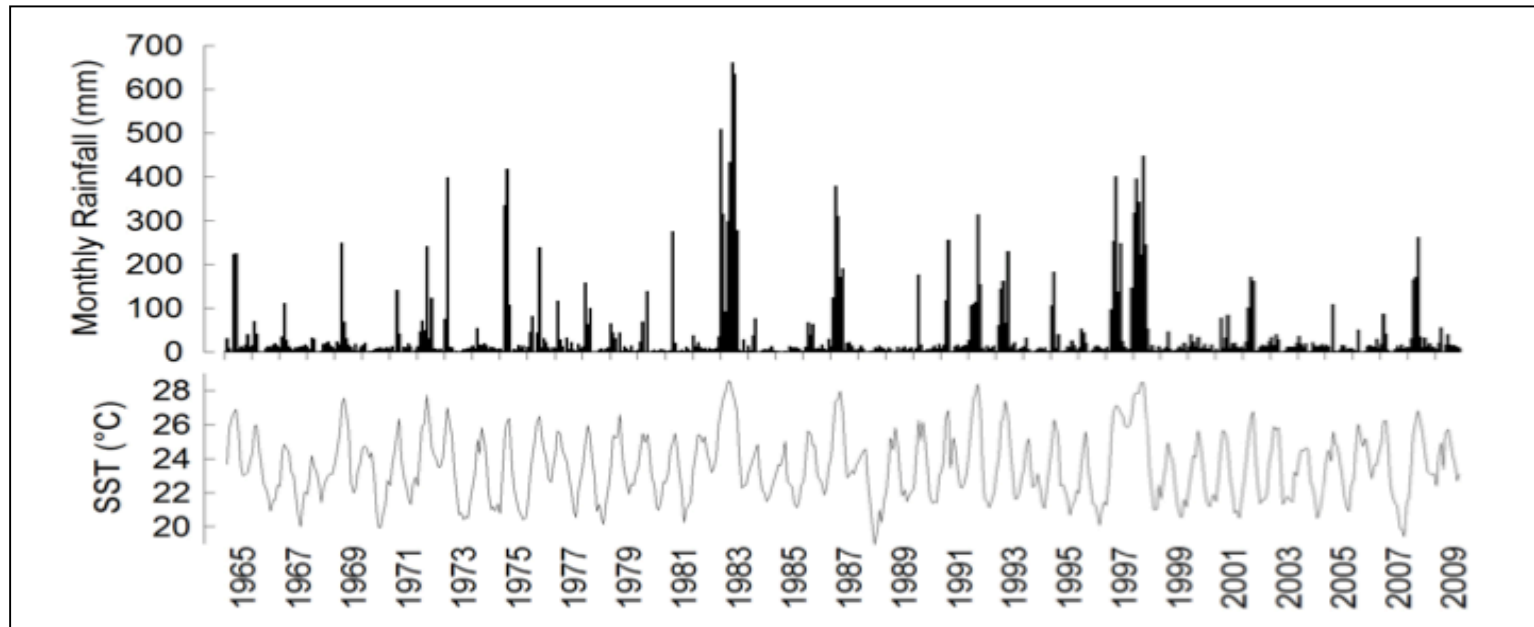


Anexo 4. Tabla tomada de la publicación de Trueman y d'Ozouville (2010). Se observa un resumen de las estadísticas de precipitación (mm) para las zonas baja (Estación Científica Charles Darwin) y alta (Bellavista) de Santa Cruz, los años con datos más extremos se muestran dentro de los paréntesis y corresponden a eventos de El Niño.

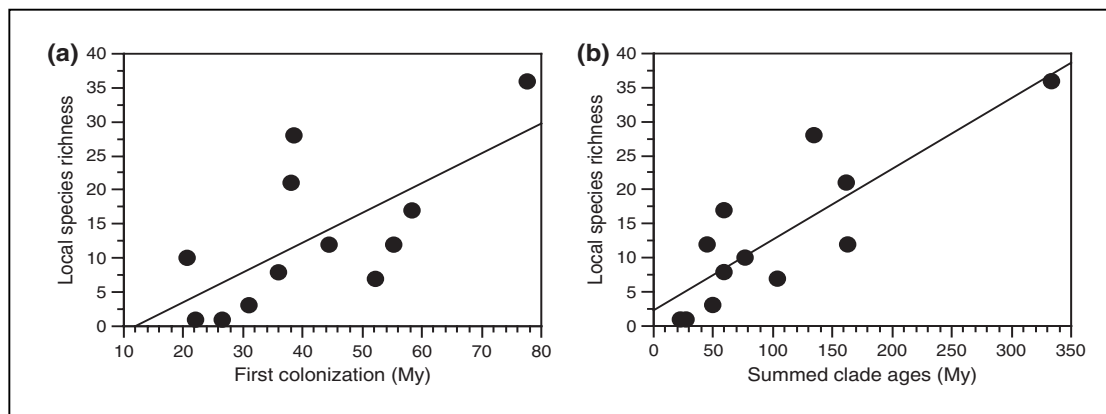
		ECCD	Bellavista
Annual	median	277	813
	minimum	64 (1985)	448 (1988)
	maximum	2769 (1983)	2666 (1997) ¹
Hot season	median	196 ²	351
Cool season	median	81	462 ³

¹ Bellavista records began in 1988; rainfall might have been higher in the El Niño year of 1983.
² 71% of annual.
³ 57% of annual.

Anexo 5. Figura tomada de la publicación de Trueman y d'Ozouville (2010). Total de precipitación mensual (mm) y medias mensuales de la temperatura superficial del mar en la Estación Científica Charles Darwin entre 1965 y 2008.



Anexo 6. Figura tomada de la publicación de Wiens *et al.* (2011), que indica la relación entre la riqueza local de especies de 12 localidades y el tiempo basado en (a) la cantidad de tiempo que cada región ha estado ocupada por hílidos, expresado en millones de años (My) tomando en cuenta la primera colonización ($r^2 = 0.454$; $P = 0.0162$); y (b) en la cantidad de tiempo que cada región ha estado ocupada por cada clado mayor de hylidos, tomando en cuenta múltiples colonizaciones en cada región ($r^2 = 0.705$; $P < 0.001$).



Anexo 7. Lista de haplotipos resultantes del análisis de diversidad, y empleados para la red de haplotipos. Las secuencias representan los sitios informativos (variables) de las secuencias de los genes 12S, ND1, CO1 y CYTB. Se muestran los individuos que presentan cada haplotipo.

Número de haplotipo	Secuencia de haplotipo	Individuos QCAZ
1	TTCTTTAGCCTCCGTAATTTGTTGAATGTACCTGGATGCAGAAAGAGGCTGATTTTTCTTCCCAGAC CGTCTACTGACCATATCAGCTACCTCGTGTCTCTGATCCGTAGTGGTCTCCGTCTGGTAGTGATAG	50860-50859
2	TTCTTTAGCCTCCGTAATTTGTTGAATATATCTGGATGCAGAAAGAGGCTGGTTTTCTTCCCAGAC CGTTTACTGACCATATCAGCTACCTCGTGTCTCTGATCCATAGTGGTCTCCGTCTGATGGTGATGG	50858
3	TTCTTTAGCCTCCGTAATTTGTTGAATATATCTGGATGCAGAAAGAGGCTGGTTTTCTTCCCAGAC CGTTTACTGACCACATCAGCTACCTCGTGCCCTCTGATCCATAGTGGTCTCCGTCTGGTGGTGATAG	50857
4	TTCTTTAACCTCCGCAATTCGTCTGAATATACCTGGATACAGAAAAAGGCCGATTCCCTTCTCAGAT CACCTACCAACCATATCAGCTATCCCACATCCCCTAGTCCGTAGTAGTCTCTATTCGGTAGTGATGG	50856
5	CTCCTCAGCCTCCACAACCTCGCTAAATACACCCAGGCACAGAAGGGGGCTGATTTTTCCCTCCGGGT TATTTACTGACCGTATTAACCTTTTCATATCCTCTAGTCTGTAGCAGTTCTCGCCCGGTAGCGATGG	50847
6	TCCCTCGGTCTCTACGATTTGTTGAGTACACCTGAGTACGGAAGAAGGTTGATTTTTCCCTCTGGGT TATTTATTGAGCGTATCAACCCTTTTATATCCTCTAATTTGTAGTAGTTCTCATTCGGTAGCAATGG	19921

Anexo 7. Continuación.

Número de haplotipo	Secuencia de haplotipo	Individuos QCAZ
7	TCCCTCGGTCTCTACGATTTGTTGAGTACACCTGAGTACGGAAGAAGGTTGATTTTCCCTCTGGGT TATTTATTGACCGTATCAACCCTTTTATATCCTCTAATTTGTAGTAGTTCTCATTCGGTAGCAATGG	22306
8	TCCCTCGGTCTCTACGATTTGTTGAATACACCTGAGTACGGAAGAAGGTTGATTTTCCCTCTGAGT TATTTATTGAGCGTATCAACCCTTTTATATCCTCTAATTTGTAGTAGTTCTCATTCGGTAGCAATGG	23346, 50658
9	TTTTTTAACTTCCGCAATTCGTCTGAATATGCCTGGATATAGAAAAAGGCCGATTCCCTTTCTCAGAT CACCTACCAACTATATCAGCTATCCCACATCCCCTAGTCCGTAGTAGTCTCTATTTCAGTAGTGATGG	23378
10	TTTTTTAACTTCCGCAATCCGTCTGGATATACCTGGATACAGATAGAGGCCGATTCCCTTTCTCAGAT CACCTACCAACCATATCAGCTATCCCACATCCCCTAGTCCGTAGTAGTCTCTATTTCGGTAGTGATGG	23385
11	TTTTTTAACTTCCGCAATTCGTCTGAATATACCTAGATATAGAAAAAGGCCGATTCCCTTTCTCAGAT CACCTACCAACTATATCAGCTATCCCACATCCCCTAGTCCGCAGTAGTCTCTATTTCAGTAGTGATGG	23398
12	TTTTTTAACTTCCGCAATTCGTCTGAATATACCTAGATATAGAAAAAGGCCGATTCCCTTTCTCAGAT CACCTACCAACTATATCAGCTATCCCACATCCTCTAGTTTGTAGTAGTTCTCATTCAGTAGCAATGG	23468

Anexo 7. Continuación.

Número de haplotipo	Secuencia de haplotipo	Individuos QCAZ
13	TTTTTTAACCTCCGCAATTCGTCGGATATACCTGGATACAGGAAGAGGCCGATTCCCTTTCTCAGAT CACCTGCCAACCATAACCAGCTATCCCACATCCCCTAGTCCGTAGTAGTCTCTATTTCGGTAGTGATGG	23539
14	TTTTTTAACCTCCGCAATTCGTCGGACATACCTGGATACAGGAAGAGGCCGATTCCCTTTCTCAGAT CACCTGCCAACCATAACCAGCTATCCCACATCCCCTAGTCCGTAGTAGTCTCTATTTCGGTAGTGATGG	23593
15	TTCTTTAGCCTCCGTAATTTGTTGAATATACCTGGATGCAGAAAGAGGCTGGTTTTTCTTCCCAGAC CGTCTACTGACCATATCAGCTACCTCGTGTCTCTGATCCATAGTGGTCTCCGTCTGGCAGTGATAG	23679
16	TTTTTTAACCTCCGCAATTCGTCGAATATACCTGGATATAGAAAAAGGCCGATTCCCTTTCTCAGAT CACCTACCAACTATATCAGCTATCCCACATCCCCTAGTCCGTAGTAGTCTCCATTTCAGTAGTGATGG	23950, 46798, 46800
17	TTTTTTAACCCCGCAATTCGTCGGATATACCTGGATACAGAAAGAGGCCGATTCCCTTTCTCAGAT CACCTACCAACCATAATCAGCTATCCCACATCCACTAGTCCGTAGTAGTCTCCATTTCGGTAGTGATGG	23951, 23952, 23957, 46794
18	TTTTTTAACCTCCGCAATTCGTCGAAAATACCTGGATATAGAAAAAGGCCGATTCCCTTTCTCAGAT CACCTACCAACTATATCAGCTATCCCACATCCCCTAGTCCGTAGTAGTCTCTATTTCAGTAGTGATGG	23953, 46793

Anexo 7. Continuación.

Número de haplotipo	Secuencia de haplotipo	Individuos QCAZ
19	TTCTTTAGCCTCCGTAATTTGTTGAATATACCTGGATGCAGAAAGAGGCTGGTTTTTCTTCCCAGAC CGTCTACTGACCATATCAGACACATCATGCCCTCTAATCAATAGTGGGCTCCGTCTGGCAGTGATAG	23954
20	TTTTTTAACCTTCGCAATTCGTCGGATATACCTGGATACAGAAAGAGGCCGATTCCCTTTCTCAGAT CACCTACCAACCATATCAGCTATCCCACATCCAAAAGTCCGTAGTAGTCTCTATTCCGGTAATGATGG	23958, 26940, 40227, 46795, 46797, 46799
21	TTCTTTAGCCTCCGTAATTTGTTGAATATATCTGGATGCAGAAAGAGGCTGGTTTTTCTTCCCAGAC CGTTTACTGACCATATCAGCTACCTCGTGTCTCTGATCCATAATGGTCTCCGTCTGGTGGTGATAG	23992
22	TTCTTTAGCCTCCGTAATTTATTGAATATACCTGGATGCAGAAAAGAGGCTGGTTTTTCTTCCCAGAC CGTTTACTGACCATATCAGCTACCTCGTGTCTCTGATCCATAGTGGTCTCCGTCTGGTAGCGATAG	26794
23	TTTTTTAACCTCCGCAATTCGTCGAATATACCTGGATATAGAAAAAGGCCGATTCCCTTTCTCAGAT CACCTACCAGCTATATCAGCTATCCCACATCCCCTAGTCCGTAGTAGTCTCTATTCCAGTAGTGATGG	26795-26801
24	TTTTTTAACCTCCGCAATTCGTCGGATATACCTGGATACAGAAAGAGGCCGATTCCCTTTCTCAGAT CACCCACCAACCATTTTCAGCTATCCCACATCTCCTAGCCCGTAGTAGTCTCTATTCCGATAGTGATGG	26802

Anexo 7. Continuación.

Número de haplotipo	Secuencia de haplotipo	Individuos QCAZ
25	TTTTTTAACTTCCGCAATTCGTCGAATATACCTGGATATAGAAAAAGGCCAATTCCTTTCTCAGAT CACCTACCAACTATATCAGCTATCCCACATCCCCTAGTCCGTAGTAGTCTCTATTTCAGTAGTGATGG	26832
26	TTTTTTAACCTCCGCAATTCGTCGGATATACCTGGATACAGGAAGAGGCCGATTCCCTTTCTCAGAT CACCTGCCAACCATACCGGCTATCCCACATCCCCTAGTCCGTAGTAGTCTCTATTTCGGTAGTGATGG	30596
27	TTTTTTAACCTCCGCAATTCGTCGGATATACCTGGATACAGAAAGAGGCCGATTCCCTTTCTCAGAT CACCTACCAACCATATCAGCTATCCCACATCCCCTAGTCCGTAGTAGTCTCTATTTCGGTAGTGATGG	31542
28	TTTTTTAACCTCCGCAATTCGTCGAATATACCTGGATATAGAAAAAGGCCGATTCCCTTTCTCAGAT CACCTACCAACTATATCAGCTATCCCACATCCCCTAGTCCGTAGTAGTCTCTATTCAATAGTGATGG	39868
29	TTTTTTAACCCCCGCAGTTCGTCGGATATACCTGGATACAGAAAGAGGCCGATTCCCTTTCTCAGAT CACCTACCAACCATATCAGCTATCCCACATCCCCTAGTCCGTAGTAGTCTCTATTTCGGTAGTGATGG	42228
30	TTCTTTAACCTCCGCAATTCGTCGGATATACCTGGATACAGAAAGAGGCCGATTCCCTTTCTCAGAT CACCTACCAACCATATCAGCTATCCCACATCCCCTAGTCCGTAGTAGTCTCTATTTCGGTAGTGATGG	42254

Anexo 7. Continuación.

Número de haplotipo	Secuencia de haplotipo	Individuos QCAZ
31	TTTTCTAACCTCCGCAATTCGTCGAATATACCTGGATACAGAAAAAGGCCGATTCCCTTTCTCAGAT CACCTACCAACCATATCAGCTATCCCACATCCCCTAGTCCGTAGTAGTCTCTATTCCGGTAGTGATGG	42255
32	TTTTTTAACCTCCGCAATTCGTCGGATATACCTGGATACAGAAAGAGGCCGACTCCCTTTCTCAGAT CACCTACCAACCACATCAGCTATCCCACATCCCCTAGTCCGTAGTAGTCTCTATTCCGGTAGTGATGG	46796
33	TTCTTTAACCTCCGCAATTCGTCGAATATACCTGGATACAGAAAAAGACCGATCCCCTTTCTCAGAT CACCTACCAACCATATCAGCTATCCCACATCCCCTAGTCCGTAGTAGTCTCTATTCCGGTAGTGATGG	50672
34	TTTTTTAACCTCCGCAATTCGTCGAATATACCTGGATACAGAAAAAGGCCGATTCCCTTTCTCAGAT CACCTACCAACCATATCAGCTATCCCACATCCCCTAGTCCGTAGTAGTCTCTATTCCGGTAGTGATGG	50677-50679
35	TTTTTTAACCTCCGCAATTCGTCGAATATACCTGGATACAGAAAAAAACCGATTCCCTTTCTCAGAT CACCTACCAACCACATCAGCTATCCCACATACCCTAGTCCGTGGTAATCTCTATTCCGGTAGTGATGG	50704
36	TTTTTTAACCTCCGCAATTCGTCGAATATACTTGGATACAGAAAAAGGCCGATTCCCTTTCTCAGAT CACCTACCAACCATATCAGCTATCCCACATCCCCTAGTTCGTAGTAGTCTCTATTCCGGTAGTGATGG	50707

Anexo 8. Fragmentos secuenciados por cada individuo dentro del estudio. Se indica la especie, número de colección (QCAZ) y provincia en la que fueron colectados los individuos.

QCAZ	Especie	Provincia	12S	ND1	COI	CYTB
23950	<i>Scinax quinquefasciatus</i>	Galápagos	X	X	X	X
23951	<i>Scinax quinquefasciatus</i>	Galápagos	X	X	X	X
23952	<i>Scinax quinquefasciatus</i>	Galápagos	X	X	X	X
23953	<i>Scinax quinquefasciatus</i>	Galápagos	X	X	X	X
23954	<i>Scinax quinquefasciatus</i>	Galápagos	X	X	X	X
23957	<i>Scinax quinquefasciatus</i>	Galápagos	X	X	X	X
23958	<i>Scinax quinquefasciatus</i>	Galápagos	X	X	X	X
46793	<i>Scinax quinquefasciatus</i>	Galápagos	X	X	X	X
46794	<i>Scinax quinquefasciatus</i>	Galápagos	X	X	X	X
46795	<i>Scinax quinquefasciatus</i>	Galápagos	X	X	X	X
46796	<i>Scinax quinquefasciatus</i>	Galápagos	X	X	X	X
46797	<i>Scinax quinquefasciatus</i>	Galápagos	X	X	X	X
46798	<i>Scinax quinquefasciatus</i>	Galápagos	X	X	X	X
46799	<i>Scinax quinquefasciatus</i>	Galápagos	X	X	X	X
46800	<i>Scinax quinquefasciatus</i>	Galápagos	X	X	X	X
26801	<i>Scinax quinquefasciatus</i>	Esmeraldas	X	X	X	X

Anexo 8. Continuación.

QCAZ	Especie	Provincia	12S	ND1	COI	CYTB
26802	<i>Scinax quinefasciatus</i>	Esmeraldas	X	X	X	X
26794	<i>Scinax quinefasciatus</i>	Esmeraldas	X	X	X	X
26795	<i>Scinax quinefasciatus</i>	Esmeraldas	X	X	X	X
22306	<i>Scinax quinefasciatus</i>	Esmeraldas	X	X	X	X
23346	<i>Scinax quinefasciatus</i>	Esmeraldas	X	X	X	X
50672	<i>Scinax quinefasciatus</i>	Manabí	X	X	X	X
50685	<i>Scinax quinefasciatus</i>	Manabí	X	X	X	X
50677	<i>Scinax quinefasciatus</i>	Manabí	X	X	X	X
50679	<i>Scinax quinefasciatus</i>	Manabí	X	X	X	X
42254	<i>Scinax quinefasciatus</i>	Los Ríos	X	X	X	X
42255	<i>Scinax quinefasciatus</i>	Los Ríos	X	X	X	X
50707	<i>Scinax quinefasciatus</i>	Manabí	X	X	X	X
50704	<i>Scinax quinefasciatus</i>	Manabí	X	X	X	X
26832	<i>Scinax quinefasciatus</i>	Guayas	X	X	X	X
19921	<i>Scinax quinefasciatus</i>	Manabí	X	X		X
23378	<i>Scinax quinefasciatus</i>	Santa Elena	X	X	X	X
23385	<i>Scinax quinefasciatus</i>	Santa Elena	X	X		X

Anexo 8. Continuación.

QCAZ	Especie	Provincia	12S	ND1	COI	CYTB
23398	<i>Scinax quinquelfasciatus</i>	Guayas	X	X		X
50858	<i>Scinax quinquelfasciatus</i>	Babahoyo	X	X	X	X
50857	<i>Scinax quinquelfasciatus</i>	Babahoyo	X	X	X	X
50856	<i>Scinax quinquelfasciatus</i>	Babahoyo	X	X	X	X
31542	<i>Scinax quinquelfasciatus</i>	Los Ríos	X	X	X	X
50860	<i>Scinax quinquelfasciatus</i>	Guyas	X	X	X	X
50859	<i>Scinax quinquelfasciatus</i>	Guayas	X	X	X	X
23468	<i>Scinax quinquelfasciatus</i>	Guayas	X	X	X	X
23539	<i>Scinax quinquelfasciatus</i>	Guayas	X	X	X	X
26940	<i>Scinax quinquelfasciatus</i>	Guayas	X	X	X	X
23593	<i>Scinax quinquelfasciatus</i>	Guayas	X	X	X	X
40227	<i>Scinax quinquelfasciatus</i>	Guayas	X	X	X	X
23679	<i>Scinax quinquelfasciatus</i>	El Oro	X	X	X	X
39868	<i>Scinax quinquelfasciatus</i>	El Oro	X	X	X	X
30596	<i>Scinax quinquelfasciatus</i>	El Oro	X	X	X	X
50847	<i>Scinax quinquelfasciatus</i>	El Oro	X	X	X	X
23992	<i>Scinax quinquelfasciatus</i>	Guayas	X	X	X	X

Anexo 8. Continuación.

QCAZ	Especie	Provincia	12S	ND1	COI	CYTB
42228	<i>Scinax quinquefasciatus</i>	Manabí		X	X	X
44597	<i>Scinax garbei</i>	Fco. De Orellana	X	X	X	X
44055	<i>Dendropsophus parviceps</i>	Sucumbíos	X			
28003	<i>Dendropsophus parviceps</i>	Sucumbíos		X	X	X

Anexo 9. Matriz de distancias genéticas basado en los genes 12S, ND1, CO1 y CYTB para los individuos de las poblaciones continentales.

QCAZ	50860	50859	50858	50857	50856	50847	19921	22306	23346	23378	23385	23398
50860	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50859	0,0006	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50858	0,0182	0,0175	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50857	0,0175	0,0168	0,0048	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50856	0,0172	0,0172	0,0052	0,0031	-	-	-	-	-	-	-	-
50847	0,0017	0,0017	0,0172	0,0165	0,0161	-	-	-	-	-	-	-
19921	0,0165	0,0165	0,0036	0,0036	0,0036	0,0156	-	-	-	-	-	-
22306	0,0155	0,0154	0,0034	0,0034	0,0031	0,0144	0,0013	-	-	-	-	-
23346	0,0265	0,0257	0,0292	0,0288	0,0292	0,0254	0,0267	0,0271	-	-	-	-
23378	0,0167	0,0163	0,0025	0,0046	0,0035	0,0156	0,0036	0,0028	0,0284	-	-	-
23385	0,0161	0,0161	0,0054	0,0036	0,0027	0,0152	0,0036	0,0031	0,0263	0,0045	-	-
23398	0,0188	0,0188	0,0031	0,0058	0,0058	0,0178	0,0040	0,0036	0,0290	0,0031	0,0058	-
23468	0,0039	0,0039	0,0201	0,0198	0,0194	0,0049	0,0194	0,0173	0,0265	0,0186	0,0190	0,0217
23539	0,0193	0,0186	0,0065	0,0048	0,0045	0,0182	0,0054	0,0052	0,0292	0,0064	0,0036	0,0076
23593	0,0027	0,0021	0,0185	0,0182	0,0185	0,0031	0,0178	0,0168	0,0257	0,0174	0,0174	0,0201
23679	0,0031	0,0024	0,0189	0,0185	0,0189	0,0034	0,0178	0,0171	0,0254	0,0174	0,0174	0,0201
23992	0,0175	0,0168	0,0017	0,0041	0,0045	0,0165	0,0027	0,0027	0,0281	0,0014	0,0045	0,0022
26794	0,0296	0,0295	0,0326	0,0326	0,0323	0,0285	0,0290	0,0295	0,0154	0,0316	0,0295	0,0313
26795	0,0292	0,0292	0,0323	0,0322	0,0319	0,0281	0,0285	0,0291	0,0151	0,0312	0,0290	0,0308
26801	0,0293	0,0289	0,0320	0,0320	0,0320	0,0282	0,0286	0,0293	0,0145	0,0312	0,0290	0,0308
26802	0,0306	0,0299	0,0326	0,0329	0,0333	0,0295	0,0294	0,0305	0,0151	0,0319	0,0299	0,0317
26832	0,0180	0,0173	0,0052	0,0038	0,0035	0,0170	0,0045	0,0038	0,0294	0,0050	0,0036	0,0067
26940	0,0172	0,0172	0,0048	0,0017	0,0034	0,0162	0,0036	0,0031	0,0289	0,0043	0,0036	0,0058
30596	0,0024	0,0024	0,0185	0,0178	0,0175	0,0027	0,0174	0,0158	0,0261	0,0170	0,0170	0,0196
31542	0,0168	0,0168	0,0021	0,0041	0,0038	0,0158	0,0027	0,0021	0,0288	0,0014	0,0045	0,0022
39868	0,0027	0,0027	0,0196	0,0189	0,0185	0,0031	0,0183	0,0168	0,0271	0,0181	0,0178	0,0205
40227	0,0168	0,0168	0,0045	0,0010	0,0028	0,0157	0,0032	0,0024	0,0290	0,0040	0,0032	0,0055
42228	0,0215	0,0215	0,0058	0,0040	0,0018	0,0202	0,0032	0,0031	0,0345	0,0042	0,0032	0,0071
42254	0,0179	0,0172	0,0048	0,0038	0,0034	0,0168	0,0036	0,0038	0,0285	0,0046	0,0018	0,0058
42255	0,0162	0,0161	0,0045	0,0027	0,0017	0,0151	0,0027	0,0021	0,0278	0,0039	0,0018	0,0049
50672	0,0158	0,0158	0,0038	0,0038	0,0034	0,0147	0,0022	0,0010	0,0278	0,0032	0,0040	0,0045
50677	0,0161	0,0161	0,0034	0,0034	0,0031	0,0151	0,0008	0,0006	0,0281	0,0028	0,0027	0,0031
50679	0,0161	0,0161	0,0034	0,0034	0,0031	0,0151	0,0008	0,0014	0,0281	0,0028	0,0036	0,0040
50685	0,0267	0,0267	0,0305	0,0298	0,0284	0,0256	0,0271	0,0274	0,0021	0,0282	0,0267	0,0294
50704	0,0175	0,0175	0,0045	0,0048	0,0045	0,0165	0,0036	0,0027	0,0295	0,0043	0,0054	0,0058

Anexo 9. Continuación

QCAZ	23468	23539	23593	23679	23992	26794	26795	26801	26802	26832	26940	30596
50860	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50859	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50858	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50857	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50856	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50847	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19921	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22306	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23346	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23378	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23385	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23398	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23468	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23539	0,0201	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23593	0,0053	0,0192	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23679	0,0056	0,0196	0,0024	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23992	0,0191	0,0055	0,0175	0,0178	-	-	-	-	-	-	-	-
26794	0,0293	0,0337	0,0302	0,0299	0,0319	-	-	-	-	-	-	-
26795	0,0289	0,0333	0,0298	0,0295	0,0316	0,0003	-	-	-	-	-	-
26801	0,0287	0,0328	0,0293	0,0289	0,0310	0,0003	0,0000	-	-	-	-	-
26802	0,0296	0,0333	0,0298	0,0295	0,0316	0,0017	0,0021	0,0014	-	-	-	-
26832	0,0203	0,0052	0,0187	0,0190	0,0045	0,0333	0,0329	0,0327	0,0336	-	-	-
26940	0,0191	0,0055	0,0182	0,0186	0,0041	0,0323	0,0320	0,0317	0,0330	0,0042	-	-
30596	0,0056	0,0196	0,0017	0,0034	0,0178	0,0292	0,0288	0,0289	0,0302	0,0177	0,0175	-
31542	0,0191	0,0062	0,0182	0,0185	0,0014	0,0312	0,0309	0,0310	0,0322	0,0038	0,0038	0,0165
39868	0,0053	0,0206	0,0021	0,0038	0,0189	0,0302	0,0298	0,0299	0,0312	0,0194	0,0186	0,0017
40227	0,0187	0,0052	0,0182	0,0185	0,0038	0,0322	0,0318	0,0319	0,0328	0,0035	0,0006	0,0171
42228	0,0238	0,0058	0,0233	0,0237	0,0049	0,0385	0,0381	0,0382	0,0399	0,0041	0,0031	0,0220
42254	0,0194	0,0045	0,0178	0,0182	0,0038	0,0323	0,0319	0,0313	0,0319	0,0035	0,0038	0,0182
42255	0,0180	0,0038	0,0172	0,0175	0,0038	0,0313	0,0309	0,0306	0,0319	0,0031	0,0024	0,0165
50672	0,0180	0,0058	0,0171	0,0175	0,0031	0,0302	0,0298	0,0299	0,0312	0,0042	0,0034	0,0161
50677	0,0183	0,0055	0,0175	0,0178	0,0027	0,0306	0,0302	0,0303	0,0316	0,0038	0,0031	0,0161
50679	0,0180	0,0055	0,0175	0,0178	0,0027	0,0306	0,0302	0,0303	0,0316	0,0038	0,0031	0,0161
50685	0,0275	0,0309	0,0274	0,0270	0,0298	0,0152	0,0149	0,0149	0,0163	0,0304	0,0295	0,0263
50704	0,0198	0,0069	0,0189	0,0192	0,0041	0,0319	0,0316	0,0317	0,0329	0,0052	0,0045	0,0178
50707	0,0183	0,0055	0,0175	0,0178	0,0027	0,0299	0,0295	0,0296	0,0309	0,0038	0,0031	0,0165

Anexo 9. Continuación

QCAZ	31542	39868	40227	42228	42254	42255	50672	50677	50679	50685	50704
50860	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50859	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50858	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50857	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50856	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50847	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19921	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22306	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23346	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23378	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23385	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23398	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23468	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23539	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23593	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23679	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23992	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26794	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26795	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26801	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26802	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26832	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26940	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30596	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31542	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39868	0,0182	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40227	0,0031	0,0182	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42228	0,0040	0,0224	0,0027	-	-	-	-	-	-	-	-
42254	0,0045	0,0192	0,0035	0,0036	-	-	-	-	-	-	-
42255	0,0034	0,0175	0,0024	0,0027	0,0027	-	-	-	-	-	-
50672	0,0024	0,0171	0,0028	0,0036	0,0041	0,0024	-	-	-	-	-
50677	0,0021	0,0175	0,0024	0,0031	0,0038	0,0027	0,0017	-	-	-	-
50679	0,0021	0,0175	0,0021	0,0022	0,0038	0,0027	0,0017	0,0014	-	-	-
50685	0,0291	0,0274	0,0293	0,0345	0,0301	0,0284	0,0281	0,0284	0,0284	-	-
50704	0,0034	0,0182	0,0038	0,0040	0,0051	0,0041	0,0024	0,0027	0,0027	0,0298	-
50707	0,0021	0,0175	0,0024	0,0031	0,0038	0,0027	0,0017	0,0014	0,0014	0,0284	0,0027

Anexo 10. Matriz de distancias genéticas basado en los genes 12S, ND1, CO1 y CYTB para los individuos de la población de Galápagos.

QCAZ	23950	23951	23952	23953	23954	23957	23958	46793	46794	46795	46796	46797	46798	46799	46800
23950	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23951	0.0037	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23952	0.0037	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23953	0.0027	0.0044	0.0044	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23954	0.0066	0.0083	0.0083	0.0045	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23957	0.0041	0.0003	0.0003	0.0048	0.0080	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23958	0.0041	0.0024	0.0024	0.0048	0.0087	0.0027	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46793	0.0031	0.0048	0.0048	0.0003	0.0041	0.0045	0.0052	-	-	-	-	-	-	-	-
46794	0.0041	0.0003	0.0003	0.0048	0.0080	0	0.0027	0.0045	-	-	-	-	-	-	-
46795	0.0044	0.0027	0.0027	0.0051	0.0083	0.0024	0.0003	0.0048	0.0024	-	-	-	-	-	-
46796	0.0044	0.0027	0.0027	0.0051	0.0083	0.0024	0.0010	0.0048	0.0024	0.0006	-	-	-	-	-
46797	0.0041	0.0024	0.0024	0.0048	0.0087	0.0027	0	0.0052	0.0027	0.0003	0.0010	-	-	-	-
46798	0	0.0037	0.0037	0.0027	0.0066	0.0041	0.0041	0.0031	0.0041	0.0044	0.0044	0.0041	-	-	-
46799	0.0041	0.0024	0.0024	0.0048	0.0087	0.0027	0	0.0052	0.0027	0.0010	0.0010	0	0.0041	-	-
46800	0.0003	0.0041	0.0041	0.0030	0.0062	0.0038	0.0044	0.0027	0.0037	0.0041	0.0041	0.0044	0.0003	0.0044	-

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Diana Alexandra Pazmiño Jaramillo, con cédula de identidad número 1003167085, autora del trabajo de graduación intitulado “Origen de las poblaciones introducidas de *Scinax quinefasciatus* (Anura:Hylidae) en las islas Galápagos”, previa a la obtención del grado académico de LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetado los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Quito, 01 de Diciembre del 2011

Srta. Diana Alexandra Pazmiño Jaramillo

C.I. 1003167085